

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



TESIS DOCTORAL

**Producción y caracterización de extractos alergénicos polimerizados de
alternaria alternata.**

Evaluación de su alergenicidad e inmunogenicidad

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Eva Abel Fernández González

Director

Enrique Fernández-Caldas Rodríguez

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



TESIS DOCTORAL

**Producción y caracterización de extractos
alergénicos polimerizados de *Alternaria alternata*.
Evaluación de su alergenicidad e inmunogenicidad.**

Eva Abel Fernández González

Director de Tesis

Enrique Fernández-Caldas Rodríguez

Madrid 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III

Programa de Doctorado: Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

**Producción y caracterización de extractos alergénicos polimerizados de
Alternaria alternata.**

Evaluación de su alergenicidad e inmunogenicidad.

Eva Abel Fernández González

Director de Tesis

Enrique Fernández-Caldas Rodríguez

Madrid 2017

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas que, aunque breves, están llenas de gratitud y cariño, me gustaría mostrar mi agradecimiento a todas las personas que han colaborado en el desarrollo de esta tesis, tanto a nivel profesional como personal.

En primer lugar, agradecer a Inmunotek S.L., especialmente a José Luis Subiza y a mi director de tesis, Enrique Fernández-Caldas, por darme la oportunidad de realizar esta tesis, por su cercanía y por su apoyo y estímulo continuo.

También a mis compañeros y amigos de Inmunotek y del Hospital Clínico Universitario San Carlos, por su colaboración y buena disposición, pero sobretodo, por sus palabras de ánimo y los buenos momentos. Y a Teresa, por su cariño y aliento.

Y por supuesto, agradecer a mis padres todo el apoyo que recibo de ellos y todo el esfuerzo que han realizado todos estos años por mis hermanos y por mí. Ellos han sido y serán siempre un referente para mí. A mis hermanos, que tanto me han enseñado y cuidado y con los que sé que siempre podré contar. Y a Richi, por su aliento y apoyo diarios.

A todos, mi más sincero agradecimiento.

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. SUMMARY	3
III. INTRODUCCIÓN	5
A. Alergia a hongos, aerobiología y prevalencia de sensibilización	8
B. Alérgenos fúngicos	14
C. Extractos alérgenos y estandarización	24
D. Mecanismos inmunológicos de la alergia y la inmunoterapia con alérgenos	25
IV. OBJETIVOS	31
V. MATERIALES Y MÉTODOS	33
A. Cultivo de <i>A. alternata</i>	33
B. Obtención de extractos alérgenos de <i>A. alternata</i>	36
C. Concentración y purificación de alérgenos	37
D. Polimerización de los extractos alérgenos	38
E. Caracterización molecular de los extractos	40
1. Cuantificación del contenido en proteína	40
2. Cuantificación del alérgeno principal Alt a 1	40
3. ELISA	40
4. SDS-PAGE y <i>Western blot</i>	41
5. Resonancia magnética nuclear (RMN)	42
6. Análisis de aminoácidos y reacción con fluorescamina (Floram)	42
7. Identificación de proteínas	43
8. Identificación de carbohidratos	44
F. Caracterización inmunológica de los extractos	44
1. ELISA de competición	44
2. Pruebas cutáneas	44
3. Análisis de la actividad enzimática	46
4. Ensayos de inmunización de ratones	46
5. Análisis estadísticos	48
G. Toxicidad de los extractos	48
VI. RESULTADOS	49
A. Cultivo de <i>A. alternata</i> . Optimización del rendimiento alérgico	49
B. Obtención de extractos nativos. Concentración y purificación de alérgenos	51

C.	Polimerización de alérgenos. Optimización del proceso	53
D.	Caracterización molecular de los extractos polimerizados.....	57
1.	SDS-PAGE y <i>Western blot</i>	57
2.	Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	58
3.	Análisis de aminoácidos y reacción con fluorescamina (Floram)	62
4.	Identificación de proteínas mediante LC-MS/MS	63
5.	Identificación de carbohidratos.....	72
E.	Caracterización inmunológica de los extractos polimerizados	72
1.	ELISA de competición.....	72
2.	Pruebas cutáneas.....	74
3.	Análisis de la actividad enzimática	76
4.	Ensayos de inmunización en ratones.....	82
F.	Estudios de toxicidad en ratones y cobayas.....	88
VII.	DISCUSIÓN	89
A.	Obtención de extractos alérgenos fúngicos.....	89
B.	Concentración y purificación de alérgenos	91
C.	Polimerización de alérgenos de <i>A. alternata</i>	93
D.	Caracterización molecular de los extractos polimerizados.....	96
E.	Caracterización inmunológica de los extractos polimerizados	98
VIII.	CONCLUSIONES	104
IX.	BIBLIOGRAFÍA	106
	ANEXO: ENSAYOS DE TOXICIDAD	124

Resumen

I. RESUMEN

Las enfermedades alérgicas suponen un importante problema de salud a nivel mundial debido a su creciente incidencia, elevada prevalencia y coste asistencial. Los hongos son la tercera causa más frecuente de patologías respiratorias y los más relacionados con un mal pronóstico del asma. Los géneros *Alternaria* y *Cladosporium* son los más frecuentemente relacionados con enfermedades respiratorias de tipo alérgico, siendo *Alternaria* el que presenta mayor prevalencia de sensibilización, sobretodo en el área Mediterránea.

La inmunoterapia específica con alérgenos es el único tratamiento efectivo para la desensibilización alérgica y que puede cambiar la historia natural de la enfermedad. Sin embargo, no está exenta de riesgos. La vacunación con extractos alérgicos del hongo *Alternaria alternata* produce frecuentemente reacciones alérgicas en los pacientes tras su administración. Existen numerosos factores que influyen en la composición alérgica de los extractos que pueden comprometer la seguridad y eficacia de las vacunas.

La modificación química de los alérgenos mediante su entrecruzamiento con glutaraldehído (polimerización) permite disminuir la alergenidad de los extractos alérgicos sin comprometer su capacidad inmunogénica. La inmunoterapia específica con alérgenos polimerizados, ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de enfermedades alérgicas producidas por pólenes, ácaros y epitelios de animales. Determinadas fuentes alérgicas presentan dificultades para polimerizar con glutaraldehído, como los alérgenos de *A. alternata*.

El objetivo principal de este trabajo fue la producción y caracterización de extractos alérgicos de *A. alternata* modificados con glutaraldehído, que presentaran una alergenidad disminuida, manteniendo su inmunogenicidad. Para ello, fue necesario optimizar y estandarizar los métodos de cultivo y purificación de alérgenos. El cultivo en un medio líquido aportó un rendimiento proteico mayor que en medio semisólido (33% de incremento). La purificación de alérgenos mediante fraccionamiento por ultrafiltración tangencial por 100 kDa, mostró una pérdida de alérgenos en la fracción de >100 kDa. Sin embargo, la purificación mediante precipitación con acetona permitió una buena recuperación

de alérgenos, concentrados y purificados. Se optimizaron y estandarizaron las condiciones de polimerización de los extractos y se procedió a su caracterización molecular mediante técnicas *in vitro* (cuantificación proteica, alergénica y de carbohidratos, perfiles electroforéticos, análisis de aminoácidos, resonancia magnética). Se confirmó la presencia de alérgenos y se identificaron proteínas potencialmente alergénicas por su homología de función y similitud de secuencia con alérgenos de otras fuentes.

La alergenicidad se evaluó mediante ELISA de competición, pruebas cutáneas en pacientes sensibilizados a *A. alternata* y análisis de la actividad enzimática; estos resultados revelaron una disminución de la potencia biológica del 89% y una reducción del tamaño de pápula producido del 73%, respecto a los extractos nativos. El análisis de la actividad enzimática también reveló una disminución de la capacidad proteolítica, sugiriendo la posibilidad de mezclar los extractos polimerizados con extractos alergénicos de gramíneas (*Phleum pratense*) y ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*). La inmunogenicidad fue evaluada mediante inmunización de ratones. El suero fue empleado para la evaluación mediante ELISA y *Western blot* de los anticuerpos producidos tras la inmunización, y la presencia de epítomos comunes en los extractos nativo y polimerizado; el bazo se utilizó para realizar estudios de proliferación de esplenocitos, mediante su estimulación con los extractos nativo y polimerizado y evaluar la presencia de epítomos T comunes en ambos extractos.

El trabajo desarrollado en la presente tesis doctoral supone la obtención de una nueva herramienta de vacunación para el tratamiento de enfermedades alérgicas producidas por *A. alternata*. La administración de estos extractos polimerizados podría disminuir el riesgo de aparición de reacciones secundarias adversas, respecto a la forma de vacunación tradicional con extractos alergénicos nativos, ofreciendo protección al paciente sensibilizado y mejorando su calidad de vida.

Summary

II. SUMMARY

Allergic diseases represent an important global health problem due to their increasing incidence, high prevalence and cost of care. Fungi are the third most frequent cause of respiratory diseases and the most related to a poor prognosis of asthma. The genera *Alternaria* and *Cladosporium* are the most frequently related to allergic respiratory diseases, being *Alternaria* the most prevalent source of sensitization, especially in the Mediterranean area.

Immunotherapy of allergic diseases is the only effective treatment for allergen desensitization and can change the natural history of the disease. However, it is not exempt of risks. Vaccination with *Alternaria alternata* allergenic extracts frequently produces allergic reactions in the patients, following its administration. Numerous factors influence the allergenic composition of the extracts which may compromise the safety and efficacy of the vaccines.

Chemical modification of allergens by crosslinking with glutaraldehyde (polymerization), allows to reduce the allergenicity of the allergenic extracts without compromising their immunogenic capacity. Specific immunotherapy with polymerized allergens has been shown to be effective in the treatment of allergic diseases caused by pollens, mites and animal epithelia. Certain allergenic sources present difficulties to polymerize with glutaraldehyde, as is the case of *A. alternata* allergens.

The main objective of this work was the production and characterization of allergenic extracts of *A. alternata* modified with glutaraldehyde with decreased allergenicity while maintaining its immunogenicity. To achieve it, it was necessary to optimize and standardize the methods of culture and the purification of allergens. The culture in a liquid medium provided a higher protein yield than in semisolid medium (a 33% increase).

Allergen purification by tangential ultrafiltration fractionation through a 100 kDa membrane pore, showed a decrease in the detection of some allergens, which remained in the fraction of >100 kDa. However, purification by acetone precipitation provided a good recovery of purified and concentrated allergens. The polymerization conditions of the extracts were optimized and standardized and *in vitro* techniques were performed for molecular characterization (protein,

allergen and carbohydrate quantification, electrophoretic profiles, amino acid analysis, nuclear magnetic resonance). The presence of allergens was confirmed and potential allergens were described, based on the homology of function and the similarity of sequence with allergens from other sources.

Allergenicity was evaluated by competition ELISA, skin tests in patients sensitized to *A. alternata* and analysis of the enzymatic activity. These results revealed a reduction of the biological potency of 89% and in the wheal size of 73%, compared to the reaction produced by the native extracts. Analysis of the enzymatic activity also revealed a decrease in the proteolytic capacity, suggesting the possibility of mixing the polymerized extracts with allergenic extracts from grasses (*Phleum pratense*) and mites (*Dermatophagoides pteronyssinus*). Immunogenicity was evaluated by mice immunization. The antibody production induced by immunization and the presence of common epitopes in the native and polymerized extracts was evaluated by ELISA and *Western blot*, using sera from immunized mice. The splenocyte proliferation studies were performed by stimulating with the native and polymerized extracts and evaluating the presence of common T epitopes in both extracts.

The work developed in this doctoral thesis supposes the development of a new vaccine for the treatment of allergic diseases produced by *A. alternata*. The administration of these polymerized extracts could reduce the risk of adverse reactions, with respect to the traditional vaccination with native allergenic extracts, offering protection to the sensitized patient and improving their quality of life.

Introducción

III. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades alérgicas constituyen un importante problema de salud pública a nivel mundial debido a su creciente incidencia y elevada prevalencia. La *World Allergy Organization* (WAO) estima que un 30-40% de la población mundial está afectada por este tipo de enfermedades ¹, siendo las más frecuentes la rinitis alérgica (400 millones de personas) y el asma (300 millones), según la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*, WHO) ². Aunque los procesos alérgicos leves y moderados prevalecen sobre los graves, se estiman en 250.000 las muertes producidas por asma en el mundo cada año ^{3, 4}. La WHO estima que sólo en asma se invierte el 1% de todos los recursos sanitarios a nivel mundial y que el impacto socioeconómico excede la suma de los costes derivados de la tuberculosis y VIH/SIDA ⁵.

El asma puede tener diversas etiologías. Sin embargo, la alergia juega un papel importante en su desarrollo en un 50% de los adultos y casi un 80% de los niños asmáticos. En un estudio realizado por la *Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica* en España se observó que la prevalencia de enfermedades alérgicas era notablemente superior en niños que en la población adulta, siendo la rinitis/conjuntivitis (44,7%) y el asma (40,5%) las manifestaciones clínicas más frecuentes, seguidas por la alergia a alimentos (14,5%) y la dermatitis atópica (11,6%)⁶.

Las principales fuentes alergénicas relacionadas con el asma y otras enfermedades alérgicas son los pólenes, los ácaros, los hongos y los epitelios de animales. Se considera que los hongos son la tercera causa más frecuente de patologías respiratorias, después de los pólenes y los ácaros, sin embargo, el asma causada por estos es el que tiene peor pronóstico. El primer caso de asma por hongos se describió en 1726, al observarse síntomas asmáticos en un paciente tras la visita a una bodega. Desde entonces, a pesar de que varios autores han relacionado a los hongos con síntomas de alergia respiratoria, el papel de estos en el desarrollo de enfermedades alérgicas ha sido poco considerado durante bastante tiempo. Ha sido frecuente encontrar publicaciones relacionadas con alergia respiratoria, incluyendo el asma alérgico ^{7, 8}, en los que no se considera a los hongos como posible agente causal ⁹⁻¹¹. Esto es debido a

que los alérgenos fúngicos pueden encontrarse en la atmósfera durante todo el año, tanto en el exterior como en el interior de los edificios, por lo que la hipersensibilidad a hongos en pacientes polisensibilizados puede verse enmascarada por la sensibilización a otras fuentes alérgicas. Además, existe cierta dificultad para establecer una relación causa-efecto entre la presencia de alérgenos fúngicos en el ambiente y la aparición de sintomatología alérgica. Los métodos tradicionales de detección y conteo se basan en el cultivo de esporas viables; sin embargo, en el ambiente pueden encontrarse, no sólo esporas fúngicas, sino también fragmentos o partículas de hongos que funcionan como fuentes de alérgenos. En los últimos años, se han desarrollado técnicas de cuantificación de alérgenos basadas en la utilización de anticuerpos específicos frente a los alérgenos principales, que pueden ser empleadas para la elaboración de calendarios aerobiológicos más completos y fiables, donde se contemplen, no sólo los niveles de pólenes en el ambiente, sino también de alérgenos fúngicos. Estos calendarios aerobiológicos pueden ayudar a los pacientes alérgicos a tomar medidas de prevención y evitar áreas en determinadas épocas del año donde los recuentos de alérgenos sean elevados.

No obstante, la dificultad para establecer una correlación entre la presencia de alérgenos fúngicos en la atmósfera y el desarrollo de síntomas alérgicos no es el único factor que ha condicionado el estudio de la alergia producida por hongos. Los extractos comerciales disponibles para el diagnóstico y tratamiento específico mediante inmunoterapia, varían mucho en su composición alérgica. La variabilidad de las cepas utilizadas y su alta tasa de mutación, los diferentes procesos de fabricación empleados (condiciones y medios de cultivo, métodos de extracción de alérgenos), o la utilización de extractos alérgicos obtenidos a partir del micelio, las esporas o los metabolitos de los hongos, son factores que condicionan la eficacia y seguridad de los productos. Dada la gran variedad de elementos que pueden influir en la calidad de los extractos alérgicos, actualmente, la inmunoterapia específica a hongos sólo se recomienda en pacientes que no mejoran con farmacoterapia.

La inmunoterapia con extractos alérgicos es el único tratamiento etiológico contra las enfermedades alérgicas respiratorias. Se ha demostrado su eficacia clínica en el tratamiento de asma y rinitis alérgica producidos por pólenes, ácaros, hongos y epitelios de animales ¹². Desde el punto de vista de

su composición, las vacunas antialérgicas son medicamentos inocuos en la mayoría de los casos. Sin embargo, la administración de los extractos alérgicos no está totalmente exenta de riesgos. Las dosis administradas deben ir paulatinamente en aumento y suelen requerir un tratamiento de larga duración para evitar la aparición de reacciones sistémicas. Se han desarrollado diferentes estrategias que permiten disminuir la alergenidad de las vacunas, como son la producción de alérgenos recombinantes con mutaciones en los epítomos IgE o las vacunas de liberación lenta de alérgenos (como la emulsión de los alérgenos en aceite, su precipitación con aluminio o la adsorción con L-tirosina). Sin embargo, la estrategia más eficaz es la modificación química de los alérgenos mediante el entrecruzamiento de éstos con glutaraldehído. Se ha demostrado que la utilización de extractos alérgicos de pólenes y ácaros polimerizados con glutaraldehído, no sólo permite disminuir el número de dosis administradas y espaciarlas en el tiempo, sino que esta modificación disminuye la alergenidad de los extractos sin comprometer su capacidad inmunogénica. Se ha observado que los alérgenos de polen polimerizados con glutaraldehído poseen sólo un 1% de la alergenidad activa de los alérgenos naturales, pero conservan totalmente su inmunogenicidad ¹³ Además, el tamaño medio molecular de los polímeros es de 100 a 1.000 veces mayor que los alérgenos naturales, lo que supone una forma de preparación más lenta, pudiéndose obviar la adición de portadores insolubles ¹³⁻¹⁵ El tamaño de los polímeros también determina el tipo de respuesta inmunológica producida, favoreciendo la endocitosis por células dendríticas, macrófagos y linfocitos B. Así, es posible incrementar la dosis inicial, alcanzándose la dosis máxima de mantenimiento con un menor número de inyecciones, lo que conlleva una mayor seguridad del tratamiento.

En los últimos años, se ha desarrollado con éxito la polimerización de alérgenos que presentaban dificultad para polimerizar en presencia de glutaraldehído, como en el caso de los alérgenos recombinantes de cacahuete (Ara h 1, Ara h 2) ¹⁶⁻¹⁸. Sin embargo, hasta el momento no había sido posible desarrollar una vacuna con alérgenos de *Alternaria alternata* polimerizados con glutaraldehído que presenten una alergenidad disminuida y que mantengan su capacidad inmunogénica.

Dado que la alergia a hongos presenta una prevalencia elevada, especialmente *A. alternata* en el área Mediterránea, y sobre todo en EEUU, y las dificultades que conlleva la obtención de vacunas específicas para su tratamiento, el objetivo principal del presente trabajo es el desarrollo de productos alergénicos estandarizados de *A. alternata*, modificados con glutaraldehído para mejorar su eficacia y seguridad. Para ello, ha sido necesario optimizar y estandarizar los procesos de cultivos, la obtención de extractos alergénicos de *A. alternata* y la polimerización de estos, analizando posteriormente su alergenicidad e inmunogenicidad mediante técnicas *in vitro* e *in vivo*. Además, se ha estudiado la interacción de los extractos polimerizados con extractos alergénicos de gramíneas y ácaros, para evaluar la posibilidad de una administración conjunta a pacientes polisensibilizados.

A. Alergia a hongos, aerobiología y prevalencia de sensibilización

Los hongos son organismos eucariotas, heterótrofos, que se alimentan por absorción de la materia orgánica que descomponen o que obtienen del organismo al que parasitan o con el que se encuentran en simbiosis. El talo o cuerpo vegetativo puede ser unicelular o multicelular, aunque la morfología más típica es la filamentosa, que se denomina micelio. El conjunto de filamentos que integran el micelio se denominan hifas, que pueden estar divididas o no por tabiques, y suelen estar recubiertas por quitina y β -1,3-glucanos, principalmente. La reproducción de los hongos se produce mayoritariamente por medio de esporas y puede ser sexual o asexual por fragmentación del micelio, gemación (en levaduras), mediante conidios (esporas asexuales no flageladas, producidas en hifas especializadas) o esporangiosporas (producidas en esporangios, células sostenidas normalmente por un pie).

Los hongos son organismos cosmopolitas, por lo que pueden encontrarse en cualquier región del mundo. Hasta el momento, se han descrito más de 100.000 especies, aunque se estima que existen al menos 1,5 millones de especies ¹⁹. De todas ellas, sólo unas centenas han sido descritos como patógenos oportunistas, produciendo enfermedades en humanos a través de 3 mecanismos específicos: infección directa, inducción de respuestas

inmunológicas desreguladas y toxicidad por metabolitos secundarios. En general, la exposición a los hongos ocurre por inhalación, contacto cutáneo o por ingestión, aunque la ruta inhalatoria es la más importante en cuanto a la producción de sintomatología respiratoria.

De las especies de hongos patógenos descritos, unos 80 géneros producen alergia tipo I (mediada por anticuerpos IgE), que suele manifestarse como rinitis alérgica y rinosinusitis, asma alérgico y dermatitis atópica ¹⁰. De éstos, los hongos más importantes pertenecen al filo Ascomycota, destacando los pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, seguidos por los filos Basidiomycota y Zygomycota ^{10, 20, 21}. Otros hongos como los del género *Candida*, *Malassezzia*, *Fusarium* o *Curvularia* también son fuentes alergénicas, aunque de menor importancia ¹⁰ (**Figura 1**).

Las reacciones alérgicas comienzan donde se depositan los alérgenos. La mayoría de las partículas inhaladas de más de 10 µm (la mayoría de los pólenes y algunas esporas) se depositan en la nasofaringe, produciendo síntomas nasales u oculares (fiebre del heno). Sin embargo, las partículas de menos de 10 µm, especialmente las de menos de 5 µm (como los fragmentos fúngicos), pueden penetrar en las vías respiratorias inferiores, donde las reacciones alérgicas tienden a manifestarse en forma de asma ²². Las alergias relacionadas con hongos implican el tracto respiratorio inferior más frecuentemente de lo que lo hacen las alergias a pólenes ²³, por lo que la exposición a componentes fúngicos, incluyendo las esporas, es un factor importante en el desencadenamiento de alergia respiratoria y asma.

A. alternata es uno de los hongos que se encuentran con más frecuencia en el ambiente y presentan una distribución mundial. Sus esporas son consideradas unas de las fuentes alérgenos aéreos sensibilizantes más abundantes y potentes ²⁴. Produce una gran variedad de manifestaciones clínicas ²⁴ como rinosinusitis alérgica ²⁵, neumonitis por hipersensibilidad o alveolitis alérgica ²⁶, oculomycosis ²⁷, onicomycosis ²⁸, infecciones de la piel ²⁹, micosis alérgica broncopulmonar ^{30, 31} y anafilaxia ³². Sin embargo, la manifestación alérgica más grave con la que se ha relacionado es el asma severo ³³, que se caracteriza por una disminución de la función pulmonar y exacerbaciones frecuentes, que pueden resultar en la muerte del paciente.

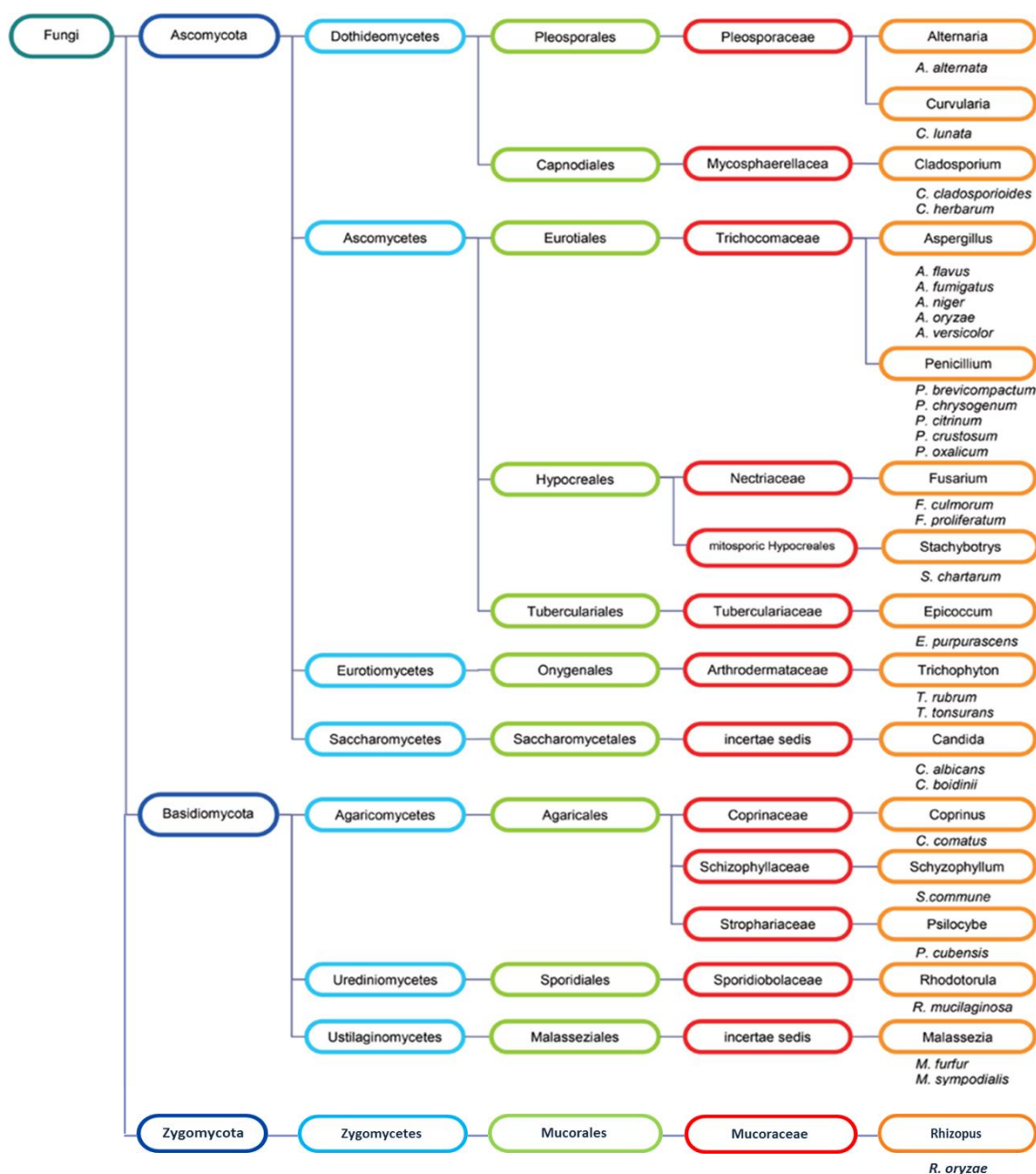


Figura 1: Especies de hongos con alérgenos descritos y aprobados por el *I.U.I.S. Allergen Nomenclature Sub-committee* (<http://www.allergen.org>). Modificado de Twaroch y col. ³⁴.

Un requisito para el desarrollo de la sensibilización alérgica es que los individuos se expongan a la fuente alérgica en cantidades clínicamente relevantes ³⁴. Se desconoce el nivel de esporas necesario para producir síntomas alérgicos en pacientes sensibilizados y varía entre especies de hongos. En el caso de

Alternaria spp., se cree que es necesaria una concentración de esporas igual o superior a 100 esporas/m³ para provocar síntomas alérgicos ³⁵, mientras que en *Cladosporium* spp. se estima que son necesarias 3.000 esporas/m³ ³⁶. Sin embargo, se ha demostrado que no sólo las esporas, sino también los fragmentos fúngicos contienen cantidades detectables de alérgenos, pudiendo funcionar como fuentes aeroalérgicas. Estas partículas están presentes en cantidades considerablemente superiores a las esporas y, en determinadas especies de hongos, tienen una mayor importancia clínica. Además, las esporas de hongos como *A. alternata*, liberan diferentes cantidades de Alt a 1 (su alérgeno principal) en función de su estado de desarrollo ³⁷, por lo que los métodos tradicionales de identificación y evaluación de la exposición a hongos, basados en el análisis morfológico y el recuento de esporas, no son suficientes para determinar los niveles de alérgenos fúngicos en el aire. Se ha observado que los síntomas alérgicos debidos a *Alternaria* spp. se correlacionan con los niveles de esporas y los niveles de Alt a 1 detectados en el ambiente. Sin embargo, la correlación entre los recuentos de esporas y los niveles de Alt a 1 es baja³⁸. Debido al efecto negativo que tienen los hongos sobre la salud, es importante realizar una correcta detección de estos y sus alérgenos. Se han desarrollado técnicas basadas en la cuantificación de proteínas y detección de ADN (ELISAs con anticuerpos monoclonales y PCRs), que permiten monitorizar la exposición a hongos, tanto en ambientes de exterior como de interior. La elaboración de calendarios aerobiológicos completos, que incorporan información sobre recuentos de esporas y niveles de alérgenos fúngicos en el ambiente, es muy útil para su utilización en estudios epidemiológicos, clínicos y ambientales.

La concentración de esporas y partículas fúngicas presentes en el aire, en ambientes de exterior, suele ser muy elevada durante todo el año, excediendo de 100 a 1.000 veces la concentración de partículas de polen^{22, 23}. Durante los meses de primavera a otoño es cuando las esporas alcanzan un mayor número en el aire. Se ha descrito que los pacientes asmáticos sensibilizados a *A. alternata*, presentan una sintomatología más severa a finales de verano y principios de otoño ³⁹, coincidiendo con los mayores recuentos de esporas registrados en el aire ⁴⁰⁻⁴². En la **Figura 2** se muestra, a modo de ejemplo, el recuento de esporas de *A. alternata* en Toledo, durante el periodo comprendido

entre Enero de 2016 y Marzo de 2017. La no inclusión de la gráfica de Madrid se debe a que no está actualmente disponible.

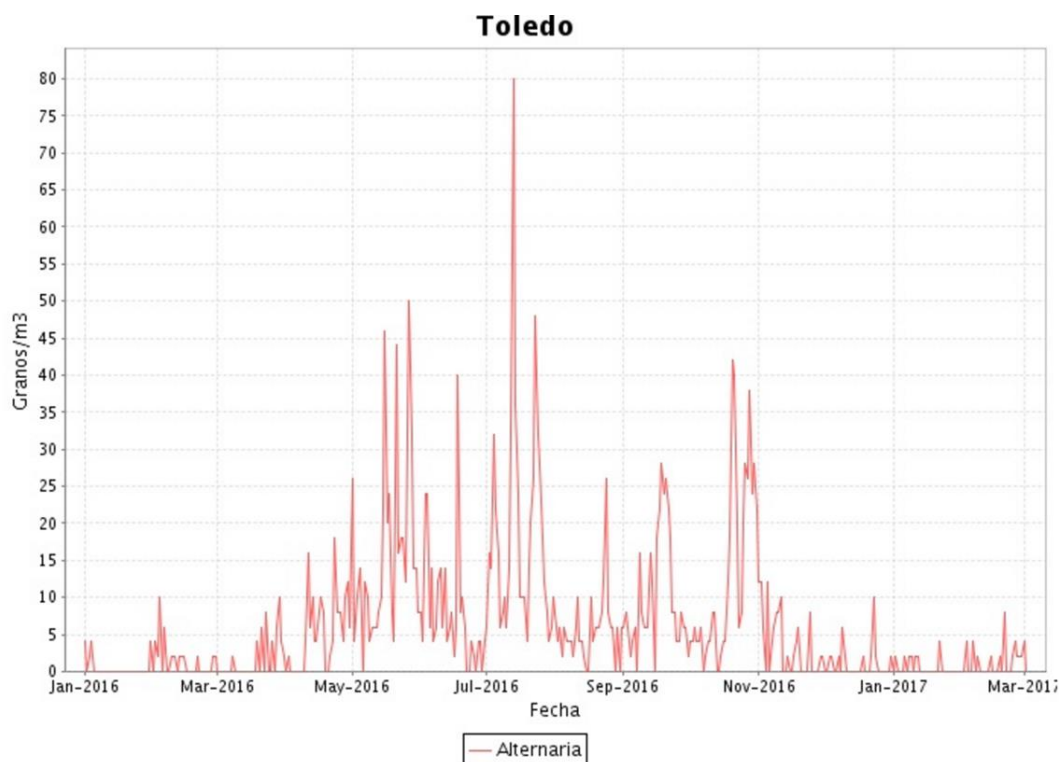


Figura 2: Ejemplo de recuento de esporas de *A. alternata* en Toledo, en el periodo de Enero de 2016 a Marzo de 2017. Fuente: Comité de Aerobiología de la SEAIC (<http://www.polenes.com>).

Los niveles de esporas fúngicas en el aire presentan un ciclo específico estacional y diario. Estos ciclos dependen del clima y las condiciones meteorológicas, de los ciclos circadianos, de factores ambientales o del acceso de las esporas a sustratos para su desarrollo ⁴³. Se ha observado una fuerte relación entre la aparición de asma asociado a tormentas y una sensibilización a *Alternaria* spp. Una elevada liberación de esporas al aire y su fragmentación en partículas fácilmente respirables, su transporte a largas distancias, una disminución repentina de la temperatura o el aumento de los niveles de ozono en la atmósfera, son algunos factores que podrían explicar la aparición de hiperreactividad bronquial debida a hongos del género *Alternaria* tras una tormenta ⁴⁴. Las prácticas agrícolas también contribuyen al aumento de los niveles de esporas de *Alternaria* spp. en el aire, al tratarse de un hongo

principalmente fitopatígeno, que puede crecer en cereales ⁴⁴. El cambio climático global y la concentración de CO₂ también parecen contribuir en la estimulación de la esporulación de *A. alternata* y la producción total de sus antígenos ⁴⁵.

Los alérgenos fúngicos pueden encontrarse tanto en ambientes de exterior como de interior a pesar de que ciertos hongos como *Alternaria* spp., o *Cladosporium* spp. son considerados alérgenos de exterior. Sin embargo, la exposición a sus alérgenos también puede producirse en el interior de los edificios ²⁴. Las esporas de los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Stachybotris* o *Ulocladium* pueden encontrarse en alfombras y camas ⁴⁶ e incluso, en edificios con problemas de humedad o con ventilación insuficiente, pudiendo provocar el llamado “síndrome del edificio enfermo” ^{47, 48}. La exposición a alérgenos de hongos puede prolongarse durante meses y su sintomatología puede ser confundida con los síntomas producidos por otros alérgenos, como los de pólenes, ácaros y epitelios de animales.

La prevalencia real de la sensibilización a hongos no está bien establecida y suele variar según los autores y las áreas geográficas de estudio. Se ha estimado que entre un 3% y un 10% de la población mundial presenta sensibilización a hongos³⁴. Un estudio multicéntrico realizado en 7 ciudades europeas por el Subcomité de Aerobiología de la Academia Europea de Alergología en 1997, concluyó que un 9,5% de los 877 pacientes estudiados con sospecha de alergia respiratoria presentaba sensibilización a los hongos *A. alternata* o *Cladosporium herbarum*, observándose la mayor prevalencia en España, con un 20% de los pacientes sensibilizados ⁴⁹. La encuesta *European Community Respiratory Health Survey* reveló que el 4,4% de la población adulta general (n=11.355) presentaban sensibilización a *Alternaria* spp. ⁵⁰. Otro estudio realizado sobre 4.962 pacientes con alergia respiratoria, mostró que la prevalencia de sensibilización a especies de los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Saccharomyces* y *Trichophyton*, determinada por prick test, era del 19% ^{11, 51}. En Polonia, 102 de 460 pacientes adultos incluidos en un estudio, demostraron ser alérgicos a hongos, siendo más frecuente la alergia a *Alternaria* spp. (47,1%) y *Cladosporium* spp. (30,8%) ⁵². Una encuesta realizada en 2005 por el *Global Allergy Asthma European Network* (GA²LEN) en 16 países de Europa, revelaron unas tasas de sensibilización

general a *A. alternata* y a *C. herbarum* del 11,9% y el 5,8%, respectivamente, con la mayor prevalencia en Norte de Europa⁵³. En 2009, en otro amplio estudio realizado por el (GA²LEN), con la colaboración de 17 centros de 14 países europeos, de los 3.034 pacientes con sospecha de alergia respiratoria estudiados, se observó una prevalencia de sensibilización a *Alternaria* spp. del 9%, con tasas de sensibilización desde el 2% en Finlandia, hasta el 24% en Grecia ^{54, 55}. En España, en el estudio *Alergológica* 1995 realizado por la *Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica* (SEAIC), el 9,5% de los pacientes con sospecha de alergia respiratoria incluidos en el estudio presentaron sensibilización a *Alternaria* spp. y/o *Cladosporium* spp. ⁵⁶.

Se ha determinado que los principales géneros de hongos causantes de alergia son *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicillium*, siendo *Cladosporium* en el norte de Europa y *Alternaria* en el área Mediterránea, los géneros más frecuentemente implicados.

La sensibilización a una única especie de hongo es muy rara. En un estudio realizado en Francia con 6.000 pacientes, sólo el 1% presentaron monosensibilización a *A. alternata* ⁵⁷. En Italia, 621 de los 2.415 pacientes con rinitis alérgica incluidos en el estudio (25,7%), presentaron monosensibilización a diferentes alérgenos, determinándose que 12 de estos pacientes presentaban monosensibilización a hongos (0,49% del total) ⁵⁸. En el *Estudio Ibérico* realizado en 2006, que incluye 3.225 pacientes de España y Portugal con rinitis alérgica, 399 presentaron sensibilización a *Alternaria* spp. Sin embargo, del 37% de los pacientes que presentaban monosensibilización a diferentes alérgenos, sólo un 0,3% lo hizo frente a *Alternaria* spp. ⁵⁹.

B. Alérgenos fúngicos

Los alérgenos son antígenos, generalmente no patogénicos, que estimulan una reacción de hipersensibilidad. Suelen ser en su mayoría proteínas y pueden encontrarse en especies desde el filo *Cnydaria* hasta *Magnoliopsida*. No se conoce por qué algunos antígenos desencadenan respuestas alérgicas y otros no, pero parece estar relacionado con ciertas características como un bajo peso molecular, una elevada glicosilación o una gran solubilidad en los líquidos

corporales ⁶⁰. Ciertas funciones biológicas parecen guardar relación con la alergenicidad, como la hidrólisis de proteínas, polisacáridos y lípidos, la unión y transporte de metales y lípidos, funciones de almacenamiento y proteínas estructurales del citoesqueleto ⁶¹. La alergenicidad que presentan determinadas proteínas con actividad enzimática podría estar relacionada con el desarrollo de las respuestas inmunológicas de tipo Th2 (mediada por IgE); estas surgieron evolutivamente como un sistema de defensa contra parásitos, muchos de los cuales dependen de enzimas para invadir o migrar a través de los tejidos ^{60, 62}. La actividad enzimática que presentan estas proteínas puede influir en la alergenicidad de otros alérgenos. Se ha demostrado que los hongos pueden producir exacerbaciones del asma, debido a que los alérgenos fúngicos con actividad enzimática pueden romper las uniones proteicas existentes entre las células del epitelio, facilitando el acceso de otros alérgenos a través de las barreras epiteliales ⁶³⁻⁶⁹. La actividad enzimática de los alérgenos puede influir además en la alergenicidad y antigenicidad de los extractos al modificar el contenido en proteína y carbohidratos ³⁴.

El estudio del genoma de los organismos y, en concreto, la obtención de la secuencia completa del genoma humano en 2001, ha impulsado el desarrollo y perfeccionamiento de nuevas herramientas biotecnológicas, que permiten ampliar el conocimiento sobre los procesos biológicos y obtener una visión global de estos. La aplicación de estas técnicas en los diferentes campos de la biología molecular ha dado lugar a las denominadas “ciencias ómicas”, entre las que se encuentran la genómica, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica.

El empleo de técnicas moleculares como la espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*, MS) ha permitido el análisis, identificación y caracterización de las proteínas presentes en un organismo o célula. Esta técnica es la más desarrollada y la más empleada en proteómica ⁷⁰. La identificación y caracterización de proteínas mediante MS, ha sido posible gracias a la disponibilidad de bases de datos de secuencias de proteínas, que permiten el estudio de la similitud de secuencia o de estructura de las proteínas. En proteómica se utilizan actualmente dos estrategias para la identificación de proteínas mediante MS. 1) La proteómica *top-down* consiste en la introducción de proteínas intactas en fase gaseosa en el espectrómetro, donde posteriormente serán separadas en función de su masa y su carga; y 2) la

proteómica *bottom-up*, donde las proteínas son separadas inicialmente mediante electroforesis en gel o por cromatografía y, tras ser sometidas a una digestión enzimática (generalmente con tripsina), se introducen en el espectrómetro. El espectro de masas obtenido en la proteómica *bottom-up* es contrastado posteriormente con bases de datos de proteínas como *UniProt*, utilizando diferentes motores de búsqueda (*MASCOT*, *ProteinPilot*, *SEQUEST*, etc.)⁷⁰. La estrategia *bottom-up* es la más avanzada y la más utilizada actualmente.

La espectrometría de masas en tándem con la cromatografía presenta alguna limitación, como una sensibilidad limitada y una elevada redundancia. En el análisis de mezclas complejas de proteínas, sólo es posible identificar una fracción de los péptidos de una proteína determinada, por lo que únicamente se obtiene información de una fracción de la secuencia de esta. Además, en mezclas complejas, debido a la abundancia de algunas proteínas se puede identificar múltiples veces una misma proteína, en detrimento de la identificación de proteínas menos abundantes^{70, 71}. En los últimos años, se están desarrollando nuevas estrategias en proteómica que permiten solventar estas limitaciones, como es el aislamiento, identificación y cuantificación selectivos de péptidos específicos, gracias a los avances realizados en cromatografía y la utilización de isótopos estables⁷¹. Estas ciencias presentan diferentes ramas de estudio a medida que se obtienen más datos, como en el caso de la inmunoproteómica.

Las técnicas “ómicas” se basan en el análisis de un gran volumen de datos por lo que se apoyan en la bioinformática para integrar la información de forma coherente. Los análisis bioinformáticos basados en la comparación de estructuras y secuencias han permitido determinar que existen casi 5.000 estructuras diferentes en la naturaleza que podrían corresponder a estructuras potencialmente alergénicas¹¹. La base de datos de alérgenos *Allergome*, incluye como alérgenos proteínas que, aunque no hayan sido completamente caracterizadas, presentan una relación estructural con otros alérgenos conocidos, o que han demostrado su capacidad de unión IgE en, al menos, una ocasión. No obstante, la reactividad IgE de un alérgeno no necesariamente refleja su capacidad de inducir síntomas alérgicos, por lo que la determinación de la capacidad de unión IgE no es suficiente para evaluar su relevancia clínica. La base de datos de la *World Health Organization and International Union of*

Immunological Societies (WHO/IUIS, www.allergen.com) es la base de datos de referencia por ser la más restrictiva y establecer unos criterios de aceptación basados en la pureza bioquímica del alérgeno (debe haber sido purificado o clonado) y en una demostrada actividad alérgica (*in vivo* e *in vitro*). Un alérgeno sólo será incluido si se demuestra su capacidad de inducir la producción de IgE en, al menos, cinco individuos ⁷². Bajo estos criterios, la WHO/IUIS establece la existencia de 866 proteínas alérgicas, siendo el 46% alérgenos de organismos pertenecientes al reino Plantae, el 40% al reino Animalia, y el 13% al reino Fungi. No obstante, a pesar de la existencia de 111 alérgenos aprobados por la WHO/IUIS, pertenecientes a 28 especies de hongos, se estima que, de las más de 100.000 especies de hongos descritas, aproximadamente unos 112 géneros podrían actuar como fuentes alérgicas ³⁴ (**Figura 3**).

A pesar de que los anticuerpos mediadores de las reacciones alérgicas (IgE) están dirigidos fundamentalmente a epítomos de naturaleza proteica, se ha descrito la existencia de anticuerpos IgE con capacidad de unión de carbohidratos responsables de reactividad cruzada (*Crossreactivity Carbohydrate Determinants*, CCDs). La relevancia clínica de los CCDs es discutida puesto que muchos de los casos de reactividad cruzada debidos a carbohidratos no se acompañan de síntomas clínicos. Además, parecen ser los responsables de resultados falsos positivos en el diagnóstico mediante cuantificación de anticuerpos IgE en suero de pacientes ^{73, 74}. Los β -glucanos son los carbohidratos predominantes en hongos (representan un 50-60% del peso seco de la pared celular) y presentan tamaños moleculares superiores a 100 kDa ⁷⁵⁻⁷⁹. Estos carbohidratos no son considerados CCDs, pero se ha descrito que los β -glucanos inducen respuestas Th2, como en el caso del alérgeno del cacahuete Ara h 1, que activa células dendríticas derivadas de monocitos humanos y la secreción de IL4 e IL13 ^{80, 81}. A pesar de que algunos estudios realizados en humanos sugieren que existe una relación dosis-respuesta entre la exposición a los glucanos fúngicos y síntomas respiratorios y cutáneos y fatiga, la información disponible desde el punto de vista alérgico de los carbohidratos de hongos es escasa ⁸²⁻⁸⁴.

DISTRIBUCIÓN TAXONÓMICA DE LOS ALÉRGENOS

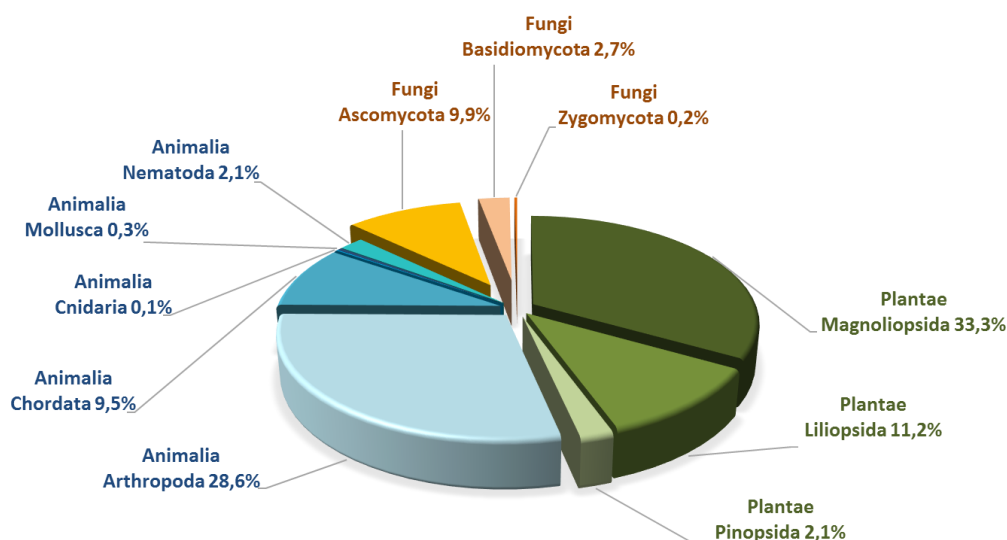


Figura 3: Distribución taxonómica de los alérgenos descritos y aceptados por la WHO/IUIS. Modificada de Crameri y col.¹¹

Los hongos producen una gran variedad de moléculas con capacidad de unión IgE, aunque no todas ellas son igual de importantes. El factor que determina la importancia de un alérgeno es la prevalencia de reconocimiento entre pacientes sensibilizados a la fuente alérgica. Así, un alérgeno puede ser clasificado como alérgeno principal, cuando más del 50% de los pacientes sensibilizados presenta IgE específica al alérgeno. Respecto a los alérgenos de *A. alternata*, hasta la fecha se han identificado y purificado 17 proteínas IgE reactivas; 12 de ellas están aceptadas por la WHO/IUIS y las otras 5, se encuentran incluidas en la base de datos *Allergome*²⁴ (**Tabla 1**). De éstas, el alérgeno principal es Alt a 1. Se trata de una glicoproteína compuesta por dos subunidades unidas por puentes disulfuro. A pesar de ser el alérgeno más estudiado de la especie, se desconoce su función biológica, aunque se cree que podría estar implicado en la germinación de las esporas y en los procesos de infección de plantas^{24, 85}. El resto de alérgenos descritos son considerados minoritarios por observarse prevalencias de sensibilización inferiores a las de Alt a 1. No obstante, existen estudios que muestran la gran relevancia de algunos

de estos alérgenos, como Alt a 13, Alt a 4 y Alt a 8, que han mostrado reactividad IgE con sueros de pacientes sensibilizados al género *Alternaria* en un 82%, 42% y 41%, respectivamente, o Alt a 70 kDa que, aunque no se incluye en la base de datos de la WHO/IUIS, produjo resultados positivos por pruebas cutáneas en el 87% (14 de 16) de los pacientes sensibilizados a *Alternaria* spp.^{21, 75, 86-89}. La reactividad IgE observada para el resto de alérgenos descritos no ha sido superior al 22%⁷².

El estudio de la similitud de secuencia y conformación de las proteínas permite la identificación de proteínas homólogas en especies relacionadas, o no, entre ellas. Esto permite explicar la existencia de reacciones alérgicas a proteínas frente a las que el individuo no presentaba sensibilización previa. Esto se denomina reactividad cruzada. La reactividad cruzada es la reacción entre un antígeno y un anticuerpo que fue generado contra un antígeno diferente pero similar. La reactividad cruzada entre proteínas puede ser debida a la presencia de secuencias proteicas o de carbohidratos comunes³⁴. Algunos de los ejemplos de proteínas que presentan reactividad cruzada son las enolasas⁹⁰⁻⁹², manganeso superóxido dismutasas (MnSOD)⁹³, ciclofilinas⁹⁴⁻⁹⁶, glutatión-S-transferasas⁹⁷, tioredoxinas^{98, 99} y transaldolasas¹⁰⁰. Además de éstas, se ha descrito reactividad cruzada entre serín-proteasas, proteínas ribosomales, las proteínas peroxisomales y proteínas de choque térmico. En la **Tabla 2** se muestra la posible reactividad cruzada entre alérgenos fúngicos sugerida por diferentes autores, resaltándose en rojo la reactividad cruzada con diferentes alérgenos (entre paréntesis) descrita en la bibliografía³⁴.

Tabla 1. Alérgenos de *A. alternata* aceptados por la WHO/IUIS y reactividades cruzadas descritas. En rojo, se incluyen los alérgenos contemplados, además, en la base de datos *Allergome*.

Alérgeno	Nombre bioquímico	Peso molecular (kDa)	Reactividad cruzada con
Alt a 1	(Función desconocida)	16,4 y 15,3	
Alt a 3	Proteína de choque térmico 70	-	
Alt a 4	Disulfuro isomerasa	57	
Alt a 5	Proteína ribosomal P2	11	
Alt a 6	Enolasa	45	Cla h 6, Pen c 22, Hev b 9
Alt a 7	Proteína YCP4	22	
Alt a 8	Manitol deshidrogenasa	29	Cla h 8
Alt a 10	Aldehído deshidrogenasa	53	
Alt a 12	Proteína ribosomal ácida P1	11	
Alt a 13	Glutación-S-transferasa	26	
Alt a 14	Manganeso superóxido dismutasa	24	Asp f 6
Alt a 15	Serín-proteasa	58	Cur l 1
Alt a TCTP	Proteína tumoral controlada traduccionalmente	13,7	Cla h TCTP, Hom s TCTP
Alt a NTF2	Factor 2 de transporte nuclear	-	Cla h NTF2
Alt a 2	(Función desconocida)	-	
Alt a 9	(Función desconocida)	42	
Alt a 70 kDa	(Función desconocida)	-	

En los hongos se han descrito numerosas proteínas que presentan reactividad cruzada con el alérgeno principal de *A. alternata* ³⁴. Además, la comparación de la secuencia de Alt a 15 con las secuencias de otros alérgenos fúngicos de la familia de las serín-proteasas en los géneros *Curvularia* (Cur l 4), *Cladosporium* (Cla h 9, Cla c 9), *Penicillium* (Pen o 18, Pen ch 18), *Aspergillus* (Asp f 18) y *Rhizopus* (Rho m 2) ha revelado una similitud de secuencia superior al 50% ¹⁰¹. Igualmente se ha observado reactividad cruzada entre otros alérgenos descritos de *A. alternata*, como por ejemplo Alt a 6 (enolasa), Alt a 8 (manitol deshidrogenasa), Alt a 13 (glutación-S-transferasa), Alt a 14 (MnSOD) y Alt a NTF2 con alérgenos de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* o *Curvularia* ^{34, 91, 101-105}. También se ha observado reactividad cruzada entre alérgenos de *A. alternata* con alérgenos de alimentos como hongos comestibles, espinacas (Síndrome *Alternaria*-espinaca) o, incluso, proteínas humanas como el factor de liberación de histamina dependiente de IgE (proteína tumoral controlada traduccionalmente, TCTP) ¹⁰⁶⁻¹¹⁰.

Dada la elevada reactividad cruzada y polisensibilización referidas a *A. alternata* con otras especies de hongos relacionados, o no, filogenéticamente, varios autores han sugerido la necesidad de realizar un diagnóstico más específico a otras fuentes alergénicas de hongos tras un diagnóstico inicial de sensibilización a *A. alternata* ¹⁰¹. No obstante, algunos autores han sugerido ausencia de reactividad cruzada entre géneros de hongos como *Alternaria* y *Penicillium*, *Alternaria* y *Cladosporium* y *Alternaria* y *Aspergillus* ^{111, 112}. Esto puede ser debido a la diferente composición molecular que presentan los extractos alergénicos en función de la cepa, a los métodos de obtención de los alérgenos empleados o, incluso, el origen de los sueros utilizados en los estudios.

Tabla 2. Reactividades cruzadas sugeridas entre alérgenos de diferentes géneros fúngicos. En rojo se resaltan las reactividades cruzadas descritas en la bibliografía.

	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Candida</i>	<i>Malassezia</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Saccharomyces</i>	Otros
Alcohol deshidrogenasa				Cand a 1				Cur l ADH
Aldehído deshidrogenasa	Alt a 10		Cla h 10					Bea b Ald
Aspartico-proteasa		Asp f 10						Cry p Aspartic protease
Catalasa		Asp n 30 Asp v Catalase A (Asp v 5)				Pen c 30		
Ciclofilina		Asp f 11 (Hom s Cyp B, Mala s 6) Asp f 27 (Hom s Cyp B)		Cand a Cyp	Mala s 6 (Asp pf 11, Hom s Cyp B)		Sac c Cyp	Cur l 3 (<i>Alternaria</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Rizhopus</i> , <i>Phleum</i> , <i>Lolium</i> , <i>Poa</i> , etc.)
Citocromo C								
Enolasa	Alt a 6 (Cla h 6, Pen c 22, Hev b 9)	Asp f 22 (Alt a 6, Pen c 22) Asp v Enolase (Asp f 7)	Cla h 6 (Alt a 6, Sac c Enolasa, Hev b 9)	Cand a Enolase (Sac c Enolase, Rho m 1)		Pen c 22 (Asp f 22)	Sac c Enolase (Cand a Enolase)	Bea b Enol Cur l 2 Rho m 1 (Cand a Enolase, Pen c 2)
Factor de transporte nuclear	Alt a NTF2 (Cla h NTF2)		Cla h NTF2 (Alt a NTF2)					
Glucoamilasa		Asp n Glucoamilasa					Sch c 1 (Asp n Glucoamilasa)	
Glutation S-Transferasa	Alt a 13	Asp f GST	Cla h GST					Cur l GST Epi p GST
Mn superóxido dismutasa		Asp f 6 (Hom s MnSOD)			Mala s 11 (Hom s MnSOD)	Pen c MnSOD	Sac c MnSOD (Asp f 6, Hom s MnSOD)	Cur l MnSOD
Manitol deshidrogenasa	Alt a 8 (Cla h 8)		Cla h 8 (Alt a 8)					
N-acetil glucosaminidasa						Pen ch 20		Bea B Hex

Tabla 2 (Cont.). Reactividades cruzadas sugeridas entre alérgenos de diferentes géneros fúngicos. En rojo se resaltan las reactividades cruzadas descritas en la bibliografía.

	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Candida</i>	<i>Malassezia</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Saccharomyces</i>	Otros
Proteína choque térmico 70	Alt a 3					Pen c 19		
Proteína membrana peroxisomal		Asp f 3 (Cand a 3)		Cand a 3 Cand b 2 (Asp f 3)	Mala f 2 Mala f 3	Pen c 3 (Asp f 3)		
Proteína unión fibrinógeno		Asp f 2						Bea b f2
Proteína ribosomal ácida P2	Alt a 5	Asp f 8 (Hom s P2)	Cla h 5					Fus c 1
Ribonucleasa		Asp f 1 (Asp r 1)						
Rotamasa		Asp f 11 (Hom s CYP B, Mala s 6)		Cand a CYP	Mala s 6 (Asp f 11, Hom s CYP B)			Psi c 2
Serín proteasa		Asp f 15						Cur l 1 Epi p 1 Tri me 2 Tri r 4 Tri t 4
Serín proteasa alcalina		Asp fl 13 (Pen c 1, Pen ch 13) Asp f 13 Asp o 13				Pen b 13 Pen ch 13 (Asp fl 13, Pen c 13, Pen c 1) Pen c 1 (Pen ch 13) Pen c 2 Pen c 13 (Cla h 91, Pen ch 13)		
Serín proteasa vacuolar		Asp fl 18 Asp n 18	Cla c 9 (Asp f 18, Pen ch 18) Cla h 9 (Asp f 18, Pen ch 13)			Pen ch 18 (Cla c 9, Pen c 18, Rho m 2) Pen c 18 (Pen ch 18, Pen o 18) Pen o 18 (Pen c 18)		Cur l 4 Rho m 2 (Pen ch 18, Pen o 18)
Tiorredoxina		Asp f 28 (Mala s 13) Asp f 29 (Mala s 13)			Mala s 13 (Asp f 28, Asp f 29, Hom s Trx)			Cur l Trx Cop c 2
Transaldolasa			Cla c 14 (Pen ch 35)			Pen ch 35 (Cla c 14)		Fus p 4

C. Extractos alérgicos y estandarización

Los extractos alérgicos son productos biológicos de composición compleja que se utilizan para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas. Se obtienen a partir de la fuente natural (materia prima) mediante la extracción de sus componentes. La composición biológica de los extractos alérgicos puede variar en función del lugar donde se obtiene la materia prima, la época en la que se recoge y/o el método de producción, así como los métodos y tiempos de elución de los alérgenos y los procesos de purificación empleados ¹¹³; estos factores determinarán la composición final y calidad de las vacunas, por lo que, en la medida de lo posible, se deben utilizar productos estandarizados, con el fin de garantizar su eficacia y seguridad.

La estandarización consiste en la obtención de productos homogéneos cuya composición refleje de forma adecuada la composición natural de la fuente alérgica. Existen dos tendencias en los métodos de estandarización. La primera se basa en la evaluación de la capacidad de unión de anticuerpos IgE de los productos alérgicos (potencia biológica), mediante la utilización de sueros (*in vitro*) o por pruebas cutáneas en pacientes sensibilizados (*in vivo*). La segunda se fundamenta en el análisis de sus componentes individuales, es decir, en la determinación de los alérgenos principales que los componen, mediante el empleo de anticuerpos específicos. Sin embargo, ambas presentan algunos inconvenientes. 1) La determinación de la potencia biológica, si bien considera la implicación de todos los componentes alérgicos, depende de la selección de los pacientes alérgicos y de los sueros empleados para su análisis. 2) La determinación de los alérgenos principales mediante ELISA, obvia la influencia del resto de alérgenos minoritarios presentes en el producto. Por ello, las Sociedades Americana y Europea de Alergia recomiendan que todas las vacunas alérgicas sean caracterizadas y estandarizadas en función de ambos factores, de forma que se puedan establecer unas unidades de medida que sirvan de referencia para la comparación entre lotes y entre los productos de los diferentes fabricantes ¹¹⁴.

Las vacunas de uso más común están disponibles como productos estandarizados; sin embargo, en la actualidad existen numerosas vacunas cuya estandarización no es posible técnica o económicamente. Uno de los factores

determinantes en la producción de extractos alergénicos es la selección de la materia prima, ya que la propia naturaleza de ésta, así como su recogida y procesamiento, puede afectar a la homogeneidad y consistencia entre lotes fabricados. Un ejemplo es el caso de frutas como las manzanas o los melocotones, en los que se han detectado diferencias en el perfil antigénico según se trate de una variedad u otra. Además, el contenido en proteína de la piel es más rico que en la pulpa, lo que plantea la idoneidad de utilizar ésta para la obtención de extractos alergénicos ¹¹⁵. En el caso de los pólenes, además de la variedad de la planta, las condiciones climáticas de los meses previos a la floración también parecen influir en su composición antigénica ^{116, 117}. A pesar de la influencia de estos factores, los extractos alergénicos de pólenes y ácaros parecen presentar una mayor reproducibilidad y homogeneidad entre lotes que los obtenidos a partir de hongos e insectos, por lo que su estandarización resulta más sencilla ¹¹⁸. En el caso de los hongos, la composición antigénica de los extractos difiere, no sólo entre cepas, como ocurre entre variedades de plantas, sino también dentro de una misma cepa, debido a la elevada tasa de mutación intrínseca del hongo. Diferentes autores han comparado la variabilidad en el contenido de Alt a 1 o en la actividad enzimática entre más de diez cepas de la misma especie cultivadas bajo idénticas condiciones ^{119, 120}. Además, se ha observado que las características morfológicas, bioquímicas y antigénicas de una cepa determinada varían según la composición nutricional del medio de cultivo utilizado y las condiciones de temperatura y humedad ^{78, 121}. A estos factores, hay que sumar la conveniencia de utilizar cultivos completos o alguna de sus fases (miceliar o metabólica) para la producción de los extractos alergénicos, así como las condiciones utilizadas durante la extracción de sus alérgenos ²².

D. Mecanismos inmunológicos de la alergia y la inmunoterapia con alérgenos

La alergia es una inmunopatología resultante de una primera exposición a un antígeno ambiental inocuo, generalmente una proteína o glicoproteína. Se trata de una reacción de hipersensibilidad tipo I, donde se producen respuestas

inmediatas mediadas por IgE. En una situación no patológica, cuando un antígeno entra por primera vez en el organismo, es procesado por células presentadoras de antígeno como macrófagos, células dendríticas o linfocitos B, que presentarán los epítomos antigénicos a linfocitos T CD4⁺ o linfocitos T *helper* (Th), a través de las moléculas de histocompatibilidad tipo II (MHCII). Así, los linfocitos T se activan, proliferan y secretan citoquinas que estimularán a los linfocitos B para su diferenciación a células de memoria y células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas (Ig), quedando el individuo inmunizado. En el caso de las alergias, los linfocitos T activados se diferencian a linfocitos Th2, productores de citoquinas como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que inducen en los linfocitos B un cambio de isotipo a IgE. Los anticuerpos IgE producidos por éstos se unen a receptores de alta afinidad (FcεRI) presentes en la superficie de mastocitos y basófilos, quedando el individuo sensibilizado. Así, cuando el alérgeno irrumpe de nuevo en el organismo, se produce el entrecruzamiento de dos o más moléculas de IgE, y se desencadena una cascada de señalización que induce la liberación del contenido de los gránulos de estas células (histamina, factores quimiotácticos, proteasas, proteoglucanos, citoquinas, etc.), iniciándose la reacción inflamatoria de tipo alérgico: vasodilatación, aumento de permeabilidad vascular y epitelial, infiltración celular (eosinófilos y linfocitos de memoria), edema, estimulación de glándulas exocrinas, broncoconstricción, etc.^{60, 122} **(Figura 4).**

La inmunoterapia con alérgenos (ITA) consiste en la administración repetida de dosis crecientes del alérgeno responsable de la alergia, con el objetivo de inducir un estado de tolerancia inmunológica a largo plazo. Los mecanismos inmunológicos por los que se desarrollan las respuestas alérgicas y los efectos de la inmunoterapia específica sobre éstos, son complejos y están influenciados por factores genéticos, además de la vía de exposición a los alérgenos y las características estructurales de éstos. No obstante, se ha observado que la ITA ejerce su acción principalmente sobre los linfocitos T reguladores (Treg), que inducen un estado de tolerancia en el individuo a través de diferentes mecanismos. Los linfocitos Treg producen IL-10 y TGF-β, citoquinas antiinflamatorias que, por un lado, inhiben la migración de mastocitos y basófilos al lugar de la inflamación y promueven fenotipos tolerogénicos de células dendríticas, también productoras de IL-10; por otro lado, inhiben la

activación de linfocitos Th2 específicos de alérgeno, por lo que disminuye la producción de las citoquinas responsables de la inducción de cambio de isotipo a IgE en los linfocitos B, desviando el cambio de isotipo hacia la producción de anticuerpos IgG4, los cuáles a su vez, bloquean la respuesta alérgica a diferentes niveles: los anticuerpos IgG4 no activan el sistema del complemento, por lo que no tienen capacidad inflamatoria, y compiten con los anticuerpos IgE por la unión al alérgeno, de forma que impiden la activación dependiente de IgE de los mastocitos ¹²³⁻¹²⁸.

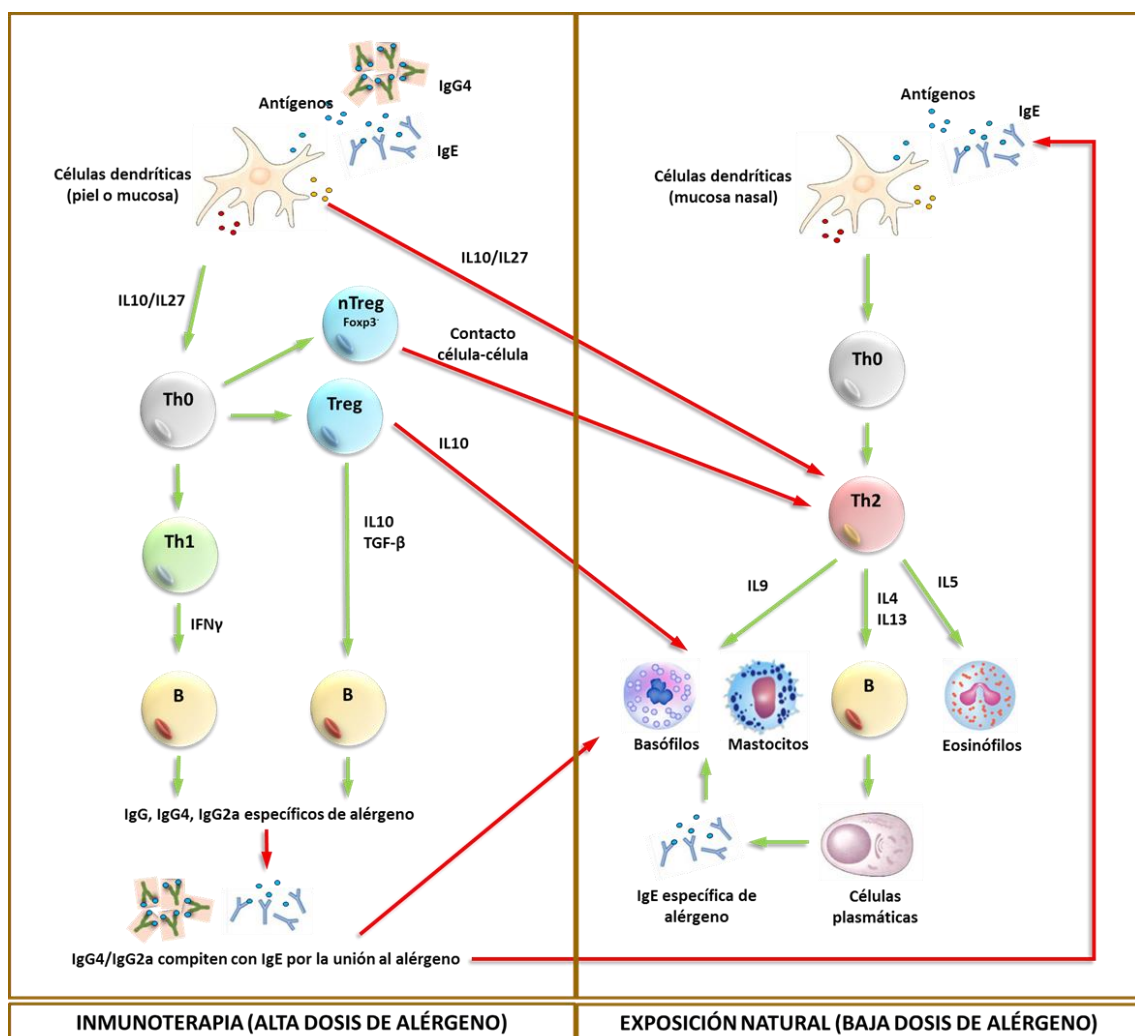


Figura 4: Mecanismos de la inmunoterapia con alérgenos. Las flechas en verde indican estimulación; las flechas en rojo indican inhibición. Modificado de Matsuoka y col.¹²⁹

Las vacunas antialérgicas, desde el punto de vista de su composición, son medicamentos inocuos en la mayoría de los casos y su efectividad es de un 80-90%, según el alérgeno o alérgenos implicados. Esta eficacia ha sido demostrada en estudios controlados en asma y rinitis alérgica producidos por ácaros, pólenes y algunos hongos y epitelios de animales ¹³⁰. Sin embargo, la administración de extractos alérgénicos, tanto por vía subcutánea como sublingual, no está totalmente exenta de riesgos. Generalmente, las reacciones más frecuentes son locales, con hinchazón o picor en el lugar de la aplicación y, aunque las reacciones más graves son infrecuentes, ocurren en los primeros minutos tras la administración y pueden comprometer la vida del paciente ¹³¹.

La eficacia de la inmunoterapia subcutánea con extractos alérgénicos de *Alternaria* spp. y *Cladosporium* spp. ha sido demostrada en adultos y niños; los estudios prospectivos y doble ciego realizados hasta el momento, han revelado una mejoría sintomatológica en los pacientes tratados, así como una disminución de los niveles de anticuerpos IgE y un aumento de los niveles de IgG en suero^{12, 57, 131-138}. Sin embargo, los extractos alérgénicos fúngicos presentan una composición compleja de proteínas, carbohidratos, además de otros componentes que no contribuyen a la alergenidad pero que pueden producir efectos adversos durante el tratamiento, por lo que la seguridad de la inmunoterapia subcutánea ha sido cuestionada ³⁴. Se ha observado que el tratamiento de pacientes asmáticos con extractos de *Alternaria* spp. y *Cladosporium* spp. producía un mayor número de reacciones severas y anafilácticas que las producidas por el polen de gramíneas, ácaros o epitelios de animales ^{139, 140}; así se ha considerado que los extractos fúngicos son menos tolerados que otros extractos alérgénicos.

Se han descrito numerosos alérgenos con capacidad proteolítica en ácaros, insectos y hongos. De las proteasas registradas en la base de alérgenos de la WHO/IUIS, más del 50% se encuentran en los hongos, siendo las serín-proteasas las más representativas ¹⁴¹. Las reacciones de hipersensibilidad tienen un papel evolutivo fundamental en la resistencia a la infección por parásitos, ya que éstos utilizan enzimas para invadir o migrar a través de los tejidos. Los mastocitos se encuentran en altas concentraciones en tejidos conectivos vascularizados, justo por debajo de las superficies epiteliales, incluyendo las mucosas del tracto respiratorio y gastrointestinal y la dermis, que son las

principales vías de entrada de parásitos y otros patógenos. Los mastocitos expresan de forma constitutiva receptores específicos de la fracción constante de IgE e IgG (FcεRI o FcγRIII) y los presentan en su membrana, de forma que cuando los anticuerpos se unen a estos receptores y se produce su entrecruzamiento por la unión del antígeno, los mastocitos se activan, desarrollando una respuesta inflamatoria ⁶⁰. De esta forma, proteasas como las serín o cisteín-proteasas pueden promover la sensibilización alérgica, al facilitar el acceso de los alérgenos a través de las barreras epiteliales. Además, las proteasas pueden inducir la expresión de citoquinas (IL6, IL8, GCSF) que, a su vez, inducen el reclutamiento, activación y mantenimiento de las células dendríticas en la superficie mucosa. Otro de los mecanismos por los que las proteasas pueden promover una respuesta alérgica es su acción directa sobre moléculas co-estimuladoras en las células dendríticas, como CD40, resultando en una inhibición de la producción de citoquinas promotoras de respuestas de tipo Th1 (IL12), predominando respuestas de tipo Th2 ^{62-69, 80}.

Se han desarrollado diferentes estrategias que permiten acortar los tratamientos para la alergia y disminuir el riesgo de desarrollo de reacciones adversas. Éstas se basan en la modificación de los alérgenos o en su adsorción a portadores insolubles (hidróxido de aluminio, fosfato cálcico, etc.). Uno de los métodos más utilizados y que ha demostrado que los productos presentan una alergenicidad disminuida sin comprometer su inmunogenicidad, es la utilización de glutaraldehído (GA). El GA es un dialdehído alifático que se une a los grupos amino libres de aminoácidos como la lisina y la arginina; su adición a los extractos alérgicos produce un entrecruzamiento químico entre las proteínas (entre las que se encuentran los alérgenos), obteniéndose polímeros de alérgenos o alergoides, que presentan unas características inmunológicas alteradas y un tamaño molecular medio muy superior al que presentan en estado natural (de 100 a 1.000 veces superior) ¹⁴².

Los alérgenos de polen polimerizados con GA pueden perder prácticamente la totalidad de la alergenicidad activa de los alérgenos naturales, conservando su inmunogenicidad ^{142, 143}. Con el proceso de polimerización con GA, los epítomos alérgicos quedan en una red macromolecular compleja, inaccesible para los anticuerpos IgE, dejando la mayoría de los determinantes antígenicos accesibles para la inducción de anticuerpos IgG. Además, los

alérgenos modificados con glutaraldehído son procesados de diferente forma a los alérgenos naturales: mientras que éstos pueden inducir la degranulación de mastocitos y basófilos y la presentación de antígenos mediada por IgE, los alergoides inducen mecanismos de fagocitosis y pinocitosis mediados por células dendríticas y monocitos/macrófagos, produciendo un equilibrio en el patrón de producción de citoquinas Th0/Th1 de las células T, lo que resulta en la producción normal de isotipos por parte de las células B de memoria. Por otro lado, se ha demostrado que los extractos polimerizados con GA pierden su capacidad proteolítica, como consecuencia de cambios en la estructura (en su sitio activo, por ejemplo), que lleven a una reducción en la accesibilidad del sustrato ^{144, 145}. Se ha observado que el entrecruzamiento de tripsina con GA produce una disminución de la afinidad de la enzima por el sustrato o que las glutámico aspártico transaminasas pierden su actividad transaminasa, pero mantienen su capacidad de unión a anticuerpos ^{146, 147}. De este modo, los extractos alérgénicos tratados con GA presentan una alergenidad disminuida.

La pérdida de actividad proteolítica por el entrecruzamiento de las enzimas con GA supone además otra ventaja: la combinación de estos extractos polimerizados con extractos alérgénicos de otras fuentes para la administración de una vacuna conjunta a pacientes polisensibilizados, sin que la estabilidad de estos alérgenos se vea afectada por una degradación enzimática. Se ha sugerido previamente la incompatibilidad de combinación determinados alérgenos, como los de hongos, insectos y ácaros, con extractos de diferentes fuentes alérgénicas, por la presencia de enzimas en su composición y el posible efecto que podrían tener éstas enzimas sobre las otras fuentes alérgénicas; por ello, algunos autores recomiendan evitar la mezcla de estos extractos. No obstante, en ocasiones estas recomendaciones estaban basadas en consideraciones teóricas. Existen varios estudios que analizan la estabilidad de los extractos alérgénicos al ser combinados con alérgenos con capacidad proteolítica, observándose que la compatibilidad depende tanto de la mezcla de extractos analizada, como de la solución en la que se encuentran (solución acuosa o glicerinada) ¹⁴⁸⁻¹⁵¹.

Objetivos

IV. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue obtener extractos alergénicos polimerizados de *A. alternata* mediante entrecruzamiento con glutaraldehído, que presenten una alergenicidad disminuida, manteniendo su capacidad inmunogénica. Dada la variedad de factores que pueden influir en la composición alergénica de los extractos fúngicos, fue necesario realizar una etapa previa de optimización y estandarización de los métodos de obtención de materia prima y purificación de alérgenos.

Así, el trabajo se dividió en dos fases con una serie de objetivos específicos:

1) Obtención de extractos alergénicos polimerizados:

- a. Mejorar el proceso de cultivo y recogida de materia prima de *A. alternata*, así como el rendimiento proteico obtenido a partir de ésta.
- b. Optimizar el proceso de purificación y concentración de alérgenos en extractos de *A. alternata*, utilizando procesos de ultrafiltración tangencial o precipitación.
- c. Determinar las condiciones óptimas para la polimerización de alérgenos de *A. alternata*.

2) Caracterización molecular de los extractos polimerizados:

- a. Evaluar la polimerización de los alérgenos de *A. alternata*, mediante el análisis de la disminución en la detección de los grupos amino implicados y determinación del tamaño molecular del extracto.

- b. Analizar el contenido proteico y de carbohidratos del extracto polimerizado e identificar la presencia de alérgenos y proteínas potencialmente alergénicas.
- c. Evaluar la alergenicidad de los extractos polimerizados mediante el análisis de su potencia biológica y actividad proteolítica.
- d. Analizar el efecto de la actividad proteolítica de los extractos de *A. alternata* sobre extractos alergénicos de *P. pratense* y *Dermatophagoides pteronyssinus*.
- e. Evaluar la capacidad inmunogénica de los extractos polimerizados mediante inmunización de ratones BALB/c y analizar la producción de anticuerpos específicos inducida.

Materiales y métodos

V. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Cultivo de *A. alternata*

Los extractos alergénicos se obtuvieron a partir de dos cepas de *A. alternata*, utilizadas de forma rutinaria en el laboratorio Inmunotek (Madrid, España), procedentes de la colección de cultivos de hongos del Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Holanda).

Ambas cepas se cultivaron a su recepción siguiendo las indicaciones del proveedor, en un medio general de agar patata-dextrosa (PDA), incubando a 25°C durante 2 semanas. Transcurrido ese tiempo, se recuperó el micelio y se conservó en alícuotas a -80 °C (**cepa de trabajo**), en una solución de NaCl 0,9% y glicerol 50%, para la realización de cultivos posteriores.

Las cepas de trabajo conservadas se cultivaron en placas de PDA y se incubaron a 25°C durante 5 días. El micelio del hongo así obtenido se utilizó como inóculo para el cultivo en grandes cantidades (cultivo en masa) en frascos de cultivo Roux, con tapón ventilado. A partir de estos cultivos en masa se obtuvieron posteriormente los extractos alergénicos.

Para el cultivo en masa se emplearon dos tipos de medio de cultivo basados en caldo Czapek, uno semisólido y otro líquido. El medio semisólido consistió en una mezcla de agar-caldo Czapek suplementado con levadura y fitona. La mezcla se esterilizó por vapor en autoclave y se dosificó en los frascos de cultivo Roux (100 ml/frasco). Una vez atemperado el medio, se inocularon los micelios y se incubaron los frascos a 25°C durante 21 días. El medio líquido consistió en una mezcla de caldo Czapek, levadura y fitona a la que, tras esterilizar por vapor en autoclave y atemperar, se adicionó fructosa (0,2% final) previamente esterilizada por filtración por vacío con filtros de acetato de celulosa de tamaño de poro de 0,2 µm (Sartorius Stedim Biotech S.A., Francia). Este medio de cultivo se dosificó en frascos de cultivo Roux (100 ml/frasco), donde se inocularon los micelios obtenidos en placa de PDA, y se incubaron los frascos a 25°C durante 21 días (**Figura 5**).

Tras el periodo de incubación, se recogieron los cultivos y se procesaron. El proceso de recogida fue ligeramente diferente según el medio de cultivo utilizado (**Figura 6**):

- **Cultivo en medio semisólido**: Se recuperó todo el contenido de los frascos Roux (micelio y medio de cultivo), se homogeneizó con una batidora de brazo y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido (fase metabólica) se inactivó mediante filtración por vacío, utilizando filtros de membrana de acetato de celulosa de tamaño de poro decreciente de 1 μm , 0,7 μm , 0,45 μm y 0,2 μm (Sartorius Stedim Biotech S.A). El precipitado obtenido de la centrifugación (fase somática) se inactivó mediante homogeneización con acetona (Ph. Eur, BP, USP-NF) grado GMP - IPEC (PanReac AppliChem,) a una relación 1:1 (v/v), dejando en agitación orbital a 25°C durante 2 horas; tras la incubación, se extendió la mezcla en bandejas y se dejó evaporar la acetona durante 18 horas, en una campana de extracción.
- **Cultivo en medio líquido**: La fase metabólica (medio líquido) se recuperó mediante volcado de los frascos en botellas de capacidad adecuada y se sometió a filtración por vacío para la eliminación de esporas (inactivación). La fase somática (micelio) se recuperó de los frascos y se inactivó con acetona siguiendo el mismo proceso que el descrito anteriormente para el medio sólido.

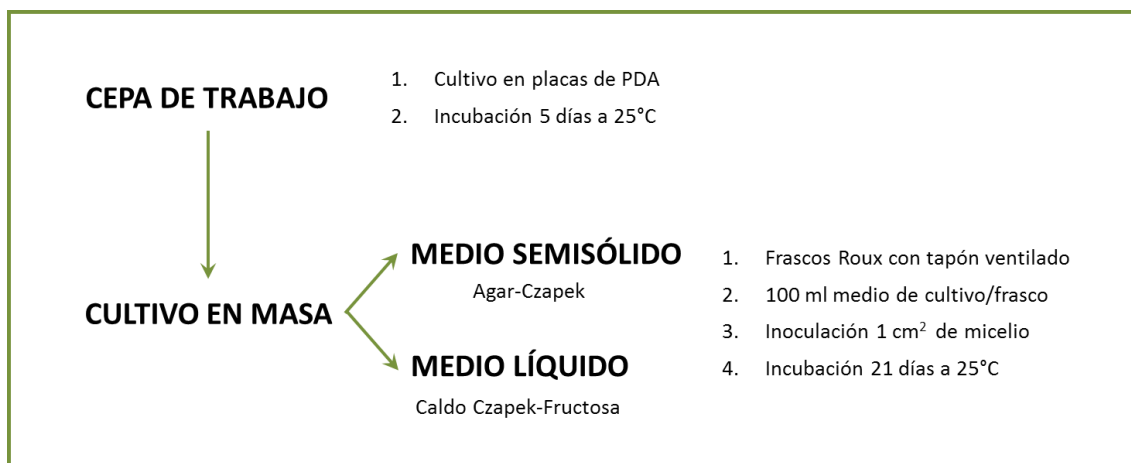


Figura 5: Obtención de cultivos en masa de *A. alternata*.

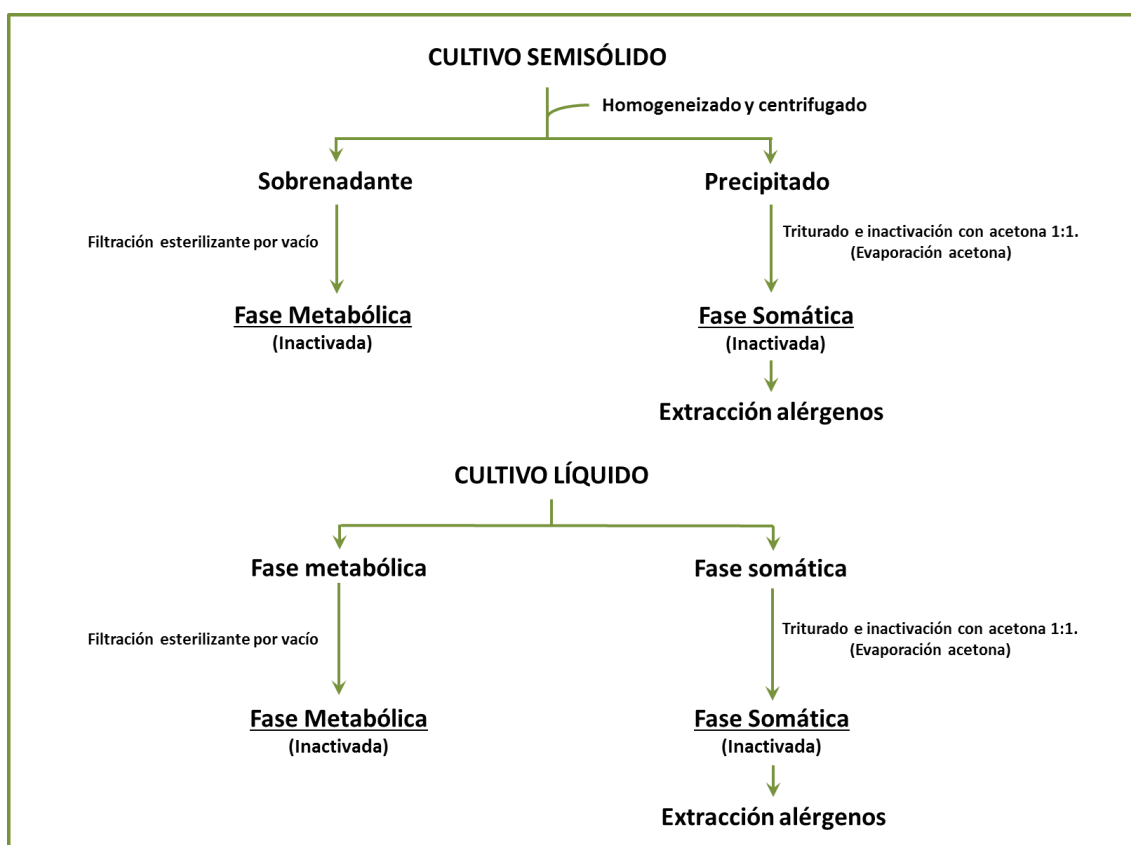


Figura 6: Recogida de la materia prima según el tipo de medio de cultivo.

B. Obtención de extractos alergénicos de *A. alternata*

Los extractos alergénicos utilizados en este trabajo (extractos nativos completos) están compuestos por los alérgenos contenidos en dos fases, una fase somática, obtenida a partir del micelio del hongo y una fase metabólica, obtenida a partir del medio de cultivo donde se ha producido el crecimiento, en el que se encuentran alérgenos y otras moléculas de secreción y excreción del hongo. La extracción de alérgenos de las fases somáticas se realizó mediante homogeneización y posterior incubación en agitación continua, con tampón fosfato salino (PBS) 0,01M pH 7,2, a una relación 1/20 p/v, a 4°C durante 40 horas. Tras la incubación, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante, desechando el precipitado. Este sobrenadante se clarificó mediante filtración por vacío a través de filtros de membrana de acetato de celulosa de tamaño de poro decreciente de 1 µm, 0,7 µm, 0,45 µm y 0,2 µm (Sartorius Stedim Biotech S.A.). No se realizó extracción de alérgenos de las fases metabólicas puesto que los alérgenos ya se encontraban solubilizados y filtrados.

Una vez filtrados los alérgenos de ambas fases, se mezclaron (extractos nativos completos) correspondientemente al tipo de medio del que procedían y se procedió a su concentración y posterior diálisis mediante ultrafiltración tangencial (UFT), utilizando membranas de polietersulfona Omega (Cassette TFF serie T, Pall Life Sciences) de tamaño de poro de 5 kDa. Las diálisis se realizaron con 10 volúmenes de agua destilada.

Los extractos nativos dializados, obtenidos a partir de ambos tipos de cultivo fueron liofilizados en viales y conservados a 4° C hasta su utilización, con el fin de conservar y evitar la degradación proteica durante todo el estudio.

C. Concentración y purificación de alérgenos

Una vez determinado el método de cultivo con el que se obtuvo el mayor rendimiento proteico (medio líquido), se procedió al desarrollo y comparación de dos procesos para la concentración y purificación de los alérgenos de los extractos obtenidos. Para ello, se emplearon los extractos nativos completos obtenidos previos al proceso de UFT por 5 kDa indicado anteriormente (**Figura 7**).

- **Concentración por fraccionamiento mediante UFT con membrana de tamaño de poro 100 kDa:** Los extractos nativos completos fueron sometidos a un proceso de ultrafiltración, utilizando una membrana de tamaño de poro de 100 kDa. Este proceso consistió en la diafiltración del extracto con 7 volúmenes de agua destilada; la fracción de más de 100 kDa obtenida se desechó, conservándose una muestra para su posterior análisis, y la fracción de menos de 100 kDa (extracto nativo) se concentró y dializó utilizando una membrana de 5 kDa, siguiendo el mismo proceso de UFT. El **extracto nativo fraccionado** obtenido (<100 kDa) fue conservado liofilizado hasta su utilización.
- **Concentración por precipitación con acetona fría:** Los extractos nativos completos se precipitaron con 3 volúmenes de acetona fría, dejando la mezcla a -20° C durante 2 horas sin agitación; posteriormente, se filtró por vacío con embudo Büchner utilizando filtros de tamaño de poro de 6 µm (Whatmann) y se recuperó el precipitado mediante resuspensión en agua destilada. Posteriormente, se filtró por vacío utilizando filtros de tamaño de poro de 0,2 µm. A continuación, se sometió a un proceso de ultrafiltración, a través de una membrana de 5 kDa, con el fin de eliminar las partículas no alergénicas de pequeño tamaño molecular y los restos de acetona. Finalmente, el **extracto nativo precipitado** (>5 kDa) se conservó liofilizado hasta su utilización.

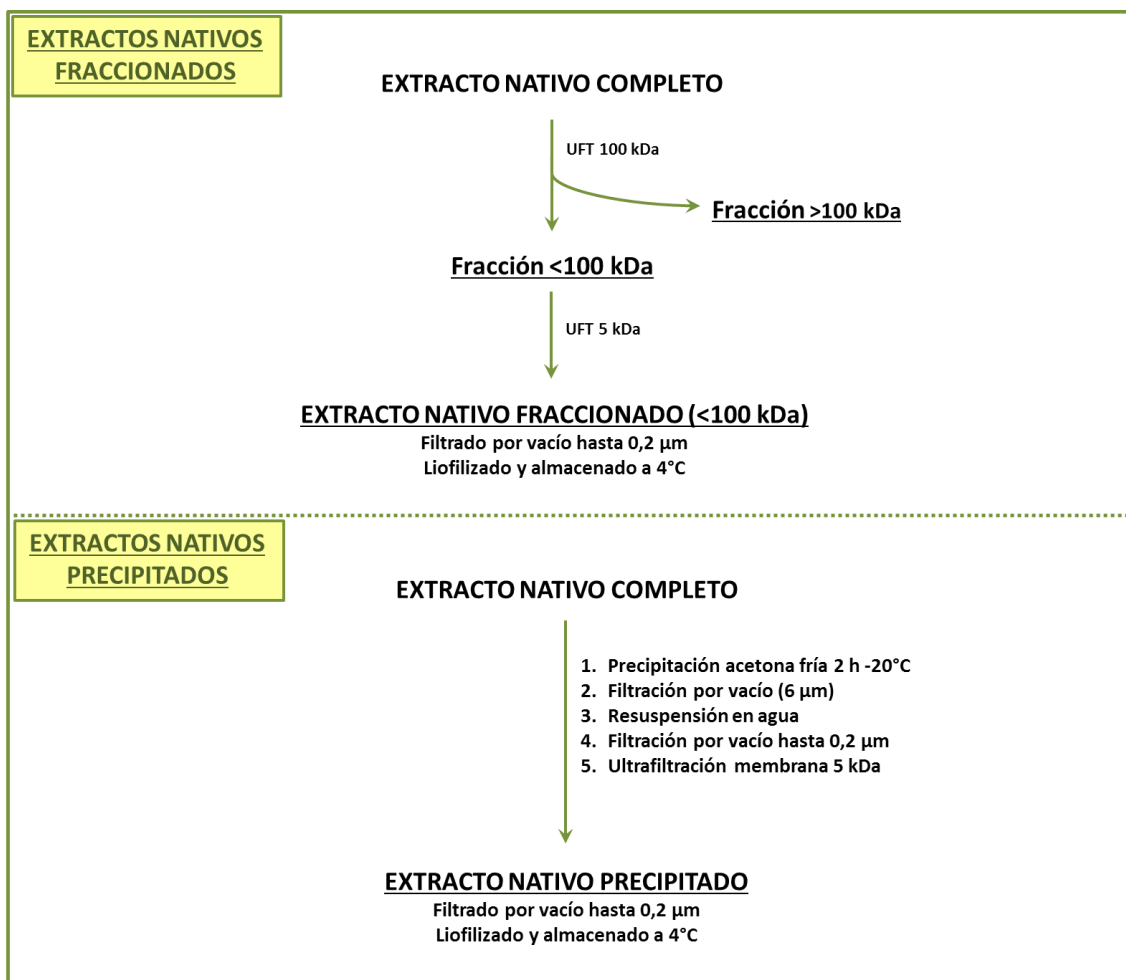


Figura 7: Concentración y purificación de alérgenos de los extractos mediante fraccionamiento por UFT (arriba) o precipitación con acetona (abajo).

D. Polimerización de los extractos alérgicos

La polimerización de los alérgenos de *A. alternata* se realizó mediante el entrecruzamiento de las proteínas con glutaraldehído (Grado I, 25% en H₂O, Sigma-Aldrich, Missouri, EE.UU.). Para ello, el extracto nativo precipitado liofilizado se resuspendió en un volumen de PBS 0,01M pH 7,2 tal, que la concentración final de proteína del extracto fuera de 0,8 mg/ml. A continuación, se adicionó el glutaraldehído (GA), gota a gota sobre los extractos, en agitación constante, y se incubaron a 4°C durante 18 horas. La parada de la reacción se realizó mediante la adición de glicina en exceso (USP, BP, Ph. Eur.) pura, grado farma (PanReac AppliChem); para ello, previamente se atemperaron los extractos a 20°C, manteniéndolos en agitación. Una vez adicionada la glicina,

los extractos se incubaron de nuevo en agitación, durante 2 horas a 4°C. Con el fin de eliminar moléculas no alergénicas de pequeño tamaño molecular (sales, glicina, etc.) y dado que el tamaño molecular esperado de las proteínas polimerizadas es superior a 100 kDa, los extractos fueron sometidos a una fase de diálisis a través de membranas de tamaño de poro de 100 kDa.

La optimización de las condiciones de polimerización de los extractos (**Figura 8**) consistió en la utilización de 8 muestras procedentes de un mismo extracto nativo, divididas en dos grupos: dializadas frente agua o frente PBS 0,01M pH 7,2. Las cuatro muestras de cada grupo se sometieron a diferentes condiciones de polimerización: una muestra de cada grupo no fue tratada con glutaraldehído, aunque sí fue sometida a las etapas de incubación, diálisis y filtración (muestras A y E). Las otras 3 muestras restantes de cada grupo, fueron tratadas con diferentes cantidades de glutaraldehído y glicina (B, C, D y F, G, H). Los dos grupos de extractos se dializaron frente 10 volúmenes de agua o de PBS, utilizando una membrana de éster de celulosa Spectra/Por (Spectrum Labs) de tamaño de poro de 100 kDa.

Extracto nativo (0,8 mg/ml)	A	B	C	D	E	F	G	H
↓ Polimerización GA (18 h 4°C agitación)	0 mM	12,5 mM	25 mM	50 mM	0 mM	12,5 mM	25 mM	50 mM
↓ Glicina (2 h 4°C agitación)	0 mM	1,25 M	1,25 mM	2,5 mM	0 mM	1,25 M	1,25 mM	2,5 mM
↓ Diálisis tripa (100 kDa)	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	PBS	PBS	PBS	PBS

Figura 8: Optimización de las condiciones de polimerización de los extractos alergénicos.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de polimerización (glutaraldehído: 0,05 M; glicina: 2,5 M), los extractos obtenidos posteriormente, fueron dializados mediante UFT con 10 volúmenes de PBS, seguidos de 10 volúmenes de agua para eliminar las sales, utilizando una membrana de tamaño

de poro de 100 kDa. Los extractos alergénicos polimerizados obtenidos de esta forma (>100 kDa), se liofilizaron en viales y se conservaron a 4°C hasta su utilización en los análisis posteriores.

E. Caracterización molecular de los extractos

1. Cuantificación del contenido en proteína

La concentración de proteína total en los extractos se determinó mediante la técnica de Bradford ¹⁵², extrapolándose los valores de absorbancia obtenidos a una longitud de onda de 595 nm, en una recta estándar de albúmina de suero bovina (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain).

2. Cuantificación del alérgeno principal Alt a 1

El contenido en alérgeno principal Alt a 1 de los extractos fue cuantificado mediante ELISA, utilizando el kit comercial Alt a 1 ELISA kit (Indoor Biotechnologies, Cardiff, Reino Unido), que emplea anticuerpos IgG monoclonales de ratón específicos al alérgeno.

3. ELISA

Los ensayos de ELISA se realizaron en placas multipocillo de alta afinidad (Greiner Bio one, Baden-Württemberg, Alemania). Las placas fueron sensibilizadas durante 16 horas a 4°C con 1 µg de proteína del extracto alergénico, en tampón carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6. Una vez sensibilizadas, las placas se lavaron con PBS 0,01M, Tween 20 0,25% (PBS-T) y se incubaron con una mezcla de sueros de pacientes sensibilizados en PBS-T, durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras lavar nuevamente, se incubaron 2 horas con anticuerpos IgG de ratón anti-IgE humana conjugados con peroxidasa (SouthernBiotech, Alabama, EE.UU.), a una dilución 1:2.000 en PBS-T-suero de ternera fetal 5%.

Para el revelado, se utilizó o-fenilendiamina 0,017M (Sigma-Aldrich), H₂O₂ 0,3% en tampón citrato/fosfato pH 5. Las reacciones enzimáticas se detuvieron adicionando HCl 1N, realizándose posteriormente las lecturas de absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro (Biotek Synergy Mx, Vermont, EE.UU.).

4. SDS-PAGE y *Western blot*

Los perfiles proteico y alergénico de los extractos se obtuvieron mediante electroforesis (SDS-PAGE) e inmunodetección (*Western blot*) con sueros humanos con IgE específica a alérgenos de *A. alternata*. Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ (BioRad, California, EE.UU.), en condiciones reductoras, según el procedimiento descrito por Laemmli¹⁵³. Para ello, se cargaron 10 µg por pocillo de las muestras, diluidas en un volumen igual de tampón de carga (Tris-HCl 0,5 mM pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,2%) y β-mercaptoetanol 5%. Como patrón de peso molecular se utilizó el marcador comercial Precision Plus Protein All Blue Standards (BioRad). La presencia de bandas se puso de manifiesto mediante la tinción de los geles con colorante Coomassie (GelCode™ Blue Stain Reagent, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.) incubando los geles en agitación constante durante 1 hora a temperatura ambiente.

Los ensayos de *Western blot*, se realizaron mediante la transferencia de las proteínas, previamente sometidas a electroforesis, a una membrana de nitrocelulosa (BioRad). Como patrón de bandas se utilizó el marcador comercial Precision Plus Protein WesternC Standards (BioRad). La transferencia se realizó a un voltaje constante (300 mV) durante 17 minutos. Posteriormente, se realizó una tinción con rojo Ponceau (Sigma-Aldrich) con el fin de confirmar la transferencia de las proteínas a las membranas. Tras decolorar con PBS-Tween 20 0,25% (PBS-T), las membranas se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) 5% PBS-T a 25°C durante 1 hora. Como anticuerpos IgE o IgG específicos de los extractos alergénicos, se empleó una mezcla de sueros comercial de pacientes sensibilizados (Plasmalab). Las membranas se incubaron con la mezcla de sueros en PBS-T - BSA 1% a una dilución 1/4, durante 18 horas a 4°C

en agitación constante. Tras el lavado de las membranas con PBS-T, se incubaron con anticuerpos de ratón anti-IgE humana o de conejo anti-IgG humana, conjugados a peroxidasa (SouthernBiotech, Alabama, EE.UU.), a una dilución 1:2.000 o 1:5.000, respectivamente, en PBS-T - BSA 5% durante 1 hora a 25°C. Para la visualización del marcador se utilizó estreptactina conjugada con peroxidasa a una dilución 1:5.000 (Precision Protein StrepTactin HRP conjugate, BioRad). Las membranas se revelaron con el kit comercial Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido).

La detección del alérgeno principal Alt a 1 mediante *Western blot* se realizó siguiendo el mismo proceso, aunque utilizando anticuerpos IgG monoclonales de ratón específicos al alérgeno (Indoor Biotechnologies), a una dilución 1:10.000, y anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados a peroxidasa, a una dilución 1:10.000.

5. Resonancia magnética nuclear (RMN)

El tamaño molecular de los extractos nativo y polimerizado de *A. alternata* fueron estimados mediante RMN, por el Departamento de Biología Química y Física del Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Para ello, se realizó una espectroscopía RMN ordenada por difusión traslacional (DOSY), en un espectrofotómetro Bruker Avance de 600 MHz con criosonda, procesándose posteriormente los espectros con el software TopSpin 3.0 (Bruker, Massachusetts, EE.UU.). La estimación de los pesos moleculares de las muestras se realizó mediante extrapolación de los resultados obtenidos con estándares de polisacáridos lineales y sulfato de poliestireno.

6. Análisis de aminoácidos y reacción con fluorescamina (Floram)

El contenido en aminoácidos de los extractos polimerizados se evaluó mediante cromatografía de gases y se comparó con el contenido en aminoácidos de los extractos nativos.

El porcentaje de pérdida de grupos amino libres del polímero, respecto a su nativo, se cuantificó mediante la técnica de Fluram (reacción con fluorescamina), utilizando concentraciones conocidas de ácido 6-aminocaproico como estándar para la extrapolación de los resultados obtenidos.

7. Identificación de proteínas

Las proteínas contenidas en los extractos nativos y polimerizados fueron identificadas mediante espectrometría de masas LC-MS/MS por la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología, CSIC. Para ello, las muestras fueron previamente precipitadas con metanol/cloroformo para eliminar cualquier sustancia interferente incompatible con el análisis. Posteriormente, se procedió a la reducción (50mM TCEP), alquilación y digestión de las proteínas con tripsina (1:20 enzima/proteína). El digerido se limpió con una columna SEP-PAK C18. Finalmente, los péptidos se separaron según su polaridad, mediante cromatografía líquida de 90 minutos, en columna de fase reversa C-18, y fragmentados en espectrómetro de masas TRIPLE-TOF (5600 TRIPLE-TOF). Los datos obtenidos se contrastaron en la base de datos de *A. alternata* del NCBI, utilizando el motor de búsqueda MASCOT. El límite establecido para considerar válida la identificación de una proteína fue la obtención de un *protein-score* mínimo de 20 y la identificación con un mínimo de 2 péptidos.

Las proteínas identificadas se contrastaron con las bases de alérgenos de *Allergome* y de la WHO/IUIS *Allergen Nomenclature Sub-committee*. Las secuencias de las proteínas identificadas en el extracto nativo fueron contrastadas con las secuencias de los alérgenos de diferentes fuentes, previamente descritos y aceptados por la WHO/IUIS, con los que mostraban homología de función. El alineamiento de las secuencias se realizó utilizando la herramienta bioinformática LALIGN (http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html), a partir del que se obtuvieron los porcentajes de similitud e identidad.

8. Identificación de carbohidratos

La identificación de los monosacáridos de los carbohidratos presentes en los extractos se realizó mediante hidrólisis y derivatización de acetatos de alditol y posterior análisis mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas. Como estándar interno se utilizó inositol. Estos análisis fueron realizados por el Servicio de Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas del CIB, CSIC.

F. Caracterización inmunológica de los extractos

1. ELISA de competición

Todos los ensayos de ELISA se realizaron en placas multipocillo de alta afinidad (Greiner Bio One, Baden-Württemberg, Alemania) sensibilizadas durante 16 horas a 4°C con 1 µg de proteína del extracto alergénico, en tampón carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6. Una vez sensibilizadas, las placas se lavaron con PBS 0,01M, Tween 20 0,25% (PBS-T) y se incubaron con diferentes concentraciones de competidor (extracto nativo o polimerizado) y una mezcla de sueros comercial de pacientes sensibilizados (Plasmalab, Washington, EE.UU.). Tras la incubación durante 16 horas a 4°C, se lavaron las placas nuevamente y se incubaron con anticuerpos IgG de ratón anti-IgE humana conjugados con peroxidasa, o anticuerpos de conejo (IgG) anti-IgG humana conjugado con peroxidasa a una dilución 1:2.000 o 1:5.000, respectivamente, en PBS-T-suero de ternera fetal 5%. Para el revelado, se utilizó o-fenilendiamina 0,017M, H₂O₂ 0,3% en tampón citrato/fosfato pH 5. Las reacciones enzimáticas se detuvieron adicionando HCl 1N, realizándose posteriormente una lectura de absorbancia a 492 nm, en un espectrofotómetro (Biotek Synergy Mx).

2. Pruebas cutáneas

Se realizaron pruebas cutáneas en pacientes sensibilizados a *A. alternata*. Estos estudios se realizaron en el ámbito del estudio titulado “Estudio de reactividad

cruzada entre diferentes alérgenos” con protocolo y código nº: INM-RCA-2011-01.

- **Pacientes**: Se seleccionaron 24 pacientes (11 hombres y 13 mujeres) con sintomatología de rinitis alérgica con o sin asma. La media de edad fue de 19 años, con un rango de 7 a 43 años.
- **Extractos**: Se realizaron pruebas cutáneas con el extracto nativo a 3 concentraciones diferentes de alérgeno principal Alt a 1: 10 µg/ml, 2,5 µg/ml y 1 µg/ml. El contenido en proteína total correspondiente a 10 µg/ml Alt a 1 fue de 333 µg/ml. Además, se realizaron pruebas cutáneas con el extracto polimerizado a una concentración de proteína total de 353 µg/ml (contenido en Alt a 1 equivalente a 10 µg/ml) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Concentración de proteína total y de Alt a 1 de los *Prick Test* ensayados en pacientes sensibilizados

TIPO DE EXTRACTO	CONCENTRACIÓN PROTEÍNA TOTAL	CONCENTRACIÓN Alt a 1
Nativo	333 µg/ml	10 µg/ml
Nativo	83,25 µg/ml	2,5 µg/ml
Nativo	33,3 µg/ml	1 µg/ml
Polimerizado	353 µg/ml	10 µg/ml

Se midieron los tamaños de área de las pápulas inducidas por cada uno de los extractos y los resultados se analizaron estadísticamente, mediante el test de Mann-Whitney. Se calculó la recta de regresión dosis-respuesta, que relaciona el tamaño de pápula inducido por cada una de las concentraciones de extracto nativo y se calculó la concentración de Alt a 1 necesaria en el extracto nativo para producir una pápula de igual tamaño a la que producen 10 µg/ml teóricos de Alt a 1 del extracto polimerizado.

3. Análisis de la actividad enzimática

Se analizó cualitativamente la presencia de 19 actividades enzimáticas de los extractos nativos mediante la utilización de galerías ApiZym (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Francia). La presencia de enzimas proteolíticas específicas en los extractos alergénicos nativos fue evaluada mediante la cuantificación de la capacidad hidrolítica específica de diferentes enzimas (tripsina, serín-proteasas, cisteín-proteasas y fosfatasas ácida y alcalina), utilizando para ello sustratos específicos para las enzimas (Azocoll, péptidos S-2288, L-1460 o NPHP, respectivamente), cuya hidrólisis resulta en la obtención de un producto coloreado. Los valores de absorbancia medidos tras las reacciones de hidrólisis fueron comparados con los resultados obtenidos con los estándares utilizados (tripsina, papaína y fosfatasas ácida o alcalina); igualmente, se evaluó esta actividad proteolítica en los extractos polimerizados.

Una vez determinada la actividad proteolítica de los extractos, se analizó su efecto sobre extractos alergénicos de *P. pratense* (gramínea) y *D. pteronyssinus* (ácaro). Para ello, se prepararon mezclas acuosas de extractos nativos de *P. pratense* o *D. pteronyssinus* (500 µg/ml) con extractos nativos o polimerizados de *A. alternata* (25 µg/ml). Como control, se utilizaron soluciones acuosas individuales de los extractos de la gramínea y del ácaro.

La estabilidad del extracto de la gramínea y del ácaro se evaluó mediante cuantificación proteica, perfil electroforético, *Western blot* y ELISA de competición, a diferentes intervalos de tiempo (1 hora, 1 semana, 1 mes y 3 meses). Para los ensayos de inmunodetección se utilizó una mezcla comercial de sueros de pacientes (Plasmalab), con IgE específica positiva a alérgenos de la gramínea o del ácaro, según correspondiera.

4. Ensayos de inmunización de ratones

Se evaluó la respuesta inmunológica inducida en ratones BALB/c tras la administración de extractos nativos y polimerizados de *A. alternata*. Para ello, se utilizaron 3 grupos de 6 ratones: 1) grupo control, 2) grupo inmunizado con extracto nativo y 3) grupo inmunizado con extracto polimerizado. Los ratones de los grupos 2 y 3 fueron inmunizados con 20 µg de proteína del extracto

correspondiente (nativo o polimerizado); a los ratones del grupo control se les administró PBS. La pauta de administración consistió en 4 inyecciones subcutáneas, a intervalos de 15 días. El sacrificio de los ratones se realizó transcurridos 7 días desde la cuarta administración. Tras el sacrificio, se procedió a la extracción de la sangre y el bazo de los ratones para su posterior análisis.

Los esplenocitos del bazo de los ratones fueron aislados mediante triturado con filtro de 0,22 μm y posterior centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos; el precipitado obtenido fue tratado con tampón de lisis de eritrocitos y centrifugado a 1.500 rpm durante 5 minutos. Tras el aislamiento, se procedió a la tinción de las células con CFSE (Succinimidil Diacetato Carboxil Fluoresceína) y su estimulación con 5 $\mu\text{g/ml}$ de extracto nativo o polimerizado durante 5 días.

El suero de los ratones se obtuvo mediante centrifugado de la sangre durante 15 minutos a 3.500 rpm y se analizaron los niveles de anticuerpos IgG, IgG1, IgG2a e IgE mediante ELISA. Para ello, se sensibilizaron placas multipocillo de alta afinidad con 1 μg de extracto nativo en tampón carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6. Tras el lavado de las placas con PBS-T, se incubaron con los sueros de ratón a una dilución 1/10.000 para la detección de IgG e IgG1, 1/2.000, para la detección de IgG2a, o una dilución 1/4 para la detección de IgE. Como anticuerpos secundarios, se emplearon anticuerpos IgG de cabra anti-IgG1, anti-IgG2a o anti-IgE específicos de ratón, conjugados con peroxidasa, a una dilución 1:2.000.

Se realizaron ensayos de *Western blot* con sueros de ratones inmunizados con el extracto polimerizado (dilución 1/10.000), para evaluar la producción de anticuerpos IgG específicos a alérgenos de *A. alternata*; como anticuerpos secundarios se emplearon anticuerpos de cabra anti-IgG, anti-IgG1, anti-IgG2a o anti-IgE de ratón, conjugados a peroxidasa (Bethyl Laboratories, Texas, EE.UU.), a una concentración 1:10.000. Los ensayos de *Western blot* de inhibición IgE fueron realizados incubando las membranas con los sueros de los ratones inmunizados a una dilución 1/10.000 y, posteriormente, con la mezcla de sueros de pacientes sensibilizados (dilución 1/4). La detección de IgE humana se realizó utilizando anticuerpos de ratón anti-IgE humana conjugados a peroxidasa, a una dilución 1:2.000. Las membranas se revelaron como se indica previamente.

Para el análisis del contenido en endotoxina de los extractos, se empleó el kit comercial Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Kinetic-QCL (Lonza, Basilea, Suiza) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Las inmunizaciones y los ensayos de proliferación de esplenocitos fueron realizados en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Clínico San Carlos.

5. Análisis estadísticos

En este trabajo se realizaron análisis de estadística descriptiva y comparativa utilizando el programa estadístico GraphPad Prism versión 5.01 para Windows, (California, EE.UU.). Se aplicaron los *tests* de Mann-Whitney y *t de Student*.

G. Toxicidad de los extractos

Se realizaron estudios de toxicidad anormal y toxicidad anormal en inmunosueros y vacunas, siguiendo las indicaciones de la Farmacopea Europea 8ª Ed. 2014. Para ello, se administró el extracto polimerizado a ratones y cobayas por vía subcutánea e intraperitoneal a una dosis de 10 µg/ml de proteína. Estos ensayos fueron realizados por el laboratorio de Toxicología y Microbiología de Biolab.

Resultados

VI. RESULTADOS

A. Cultivo de *A. alternata*. Optimización del rendimiento alergénico

La comparación del aporte proteico total de los extractos obtenidos a partir de los dos tipos de cultivo reveló un rendimiento superior en el extracto obtenido a partir del cultivo en medio líquido (un 33,5% superior). Durante el proceso de recogida, se tomaron muestras de las fases somática y metabólica y se analizó el aporte proteico de cada una de éstas; las fases metabólicas contenían, aproximadamente, el 86% de la proteína total del extracto y las fases somáticas, el 14%, en ambos tipos de cultivo. El porcentaje de alérgeno principal, Alt a 1, contenido en los extractos fue similar en los dos tipos de cultivo, representando un 1,8% de la proteína total en el cultivo semisólido y un 1,9% en el cultivo líquido. Las fases metabólicas son las que proporcionaron el mayor aporte de este alérgeno, en un 1,6% y un 1,2% de la proteína total de los extractos (**Tabla 4**).

El análisis de los resultados de SDS-PAGE de los extractos obtenidos a partir de los dos tipos de cultivo reveló que la fase somática presentaba un contenido proteico diferente al de la fase metabólica, tanto en el caso del cultivo semisólido como en el líquido (**Figura 9A**). Además, la comparación de los perfiles de ambos extractos nativos completos, compuestos por las respectivas fases somáticas y metabólicas, mostró diferencias en cuanto al aporte proteico de cada método de cultivo (**Figura 9B**); del mismo modo, se observaron diferencias en los perfiles alergénicos de los extractos completos, aunque las bandas de gran intensidad detectadas en ambos extractos eran coincidentes en tamaño, pudiendo corresponder con los alérgenos Alt a 1 y Alt a 8, de 15-16kDa y 29 kDa, respectivamente (**Figura 9C**).

Tabla 4. Rendimientos proteicos de los extractos alergénicos obtenidos a partir de cultivos en medio semisólido y líquido.

Cultivo	Fase	Proteína total	% Alt a 1	Proteína total cultivo	% Alt a 1 cultivo
Semisólido	Metabólica	50,82 mg	1,6 %	59,26 mg	1,8 %
	Somática	8,44 mg	0,2 %		
Líquido	Metabólica	76,79 mg	1,2 %	89,1 mg	1,9 %
	Somática	12,31 mg	0,7 %		

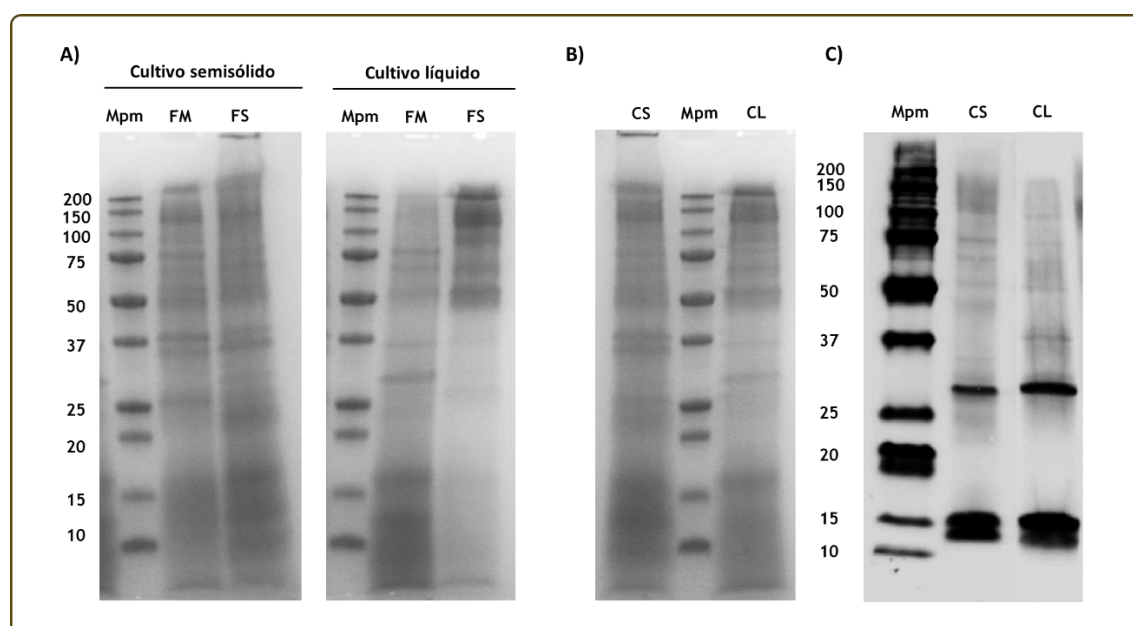


Figura 9: Perfiles electroforéticos de los extractos obtenidos a partir de los dos tipos de cultivo de *A. alternata*. A) Perfiles proteicos de las fases metabólicas (FM) y somáticas (FS) de los cultivos semisólido y líquido; B) Perfil proteico y C) perfil alergénico de los extractos nativos completos obtenidos a partir de los cultivos semisólido (CS) y líquido (CL). Mpm: marcador de peso molecular.

Dado que ambos tipos de cultivo ofrecen una variedad de proteínas de diferentes tamaños moleculares y una igual aportación en alérgeno principal, el criterio de elección del método de cultivo se basó en el rendimiento proteico obtenido y la facilidad de recogida, siendo el método de cultivo en medio líquido el seleccionado para la obtención posterior de los extractos alergénicos de *A. alternata*.

B. Obtención de extractos nativos. Concentración y purificación de alérgenos

Una vez determinado el tipo de cultivo, se procedió a la optimización del procesamiento de los extractos con el fin de concentrar los alérgenos y eliminar moléculas no alergénicas. Se analizaron y compararon los perfiles electroforéticos de los extractos fraccionados por UFT y los precipitados con acetona. Además, se analizó mediante ELISA la capacidad de unión IgE de cada una de las fracciones obtenidas por UFT.

La fracción de >100 kDa de los extractos fraccionados por UFT, tras ser sometida a electroforesis en condiciones reductoras, presentó en su perfil proteico varias bandas correspondientes a proteínas de tamaño inferior a 100 kDa. Los resultados obtenidos en los ensayos de ELISA revelaron que además, esta fracción de >100 kDa, presenta antígenos con capacidad de unión IgE (**Figura 10**). Ambas fracciones fueron analizadas mediante espectrometría de masas para determinar la presencia de alérgenos (**Tabla 5**). 11 de los 12 alérgenos aceptados por la WHO/IUIS fueron identificados en la fracción de >100 kDa, mientras que en la fracción de <100 kDa se detectaron 6 de ellos.

Los extractos precipitados con acetona no presentaron diferencias respecto a su perfil proteico previo a la precipitación y los resultados de ELISA mostraron resultados similares en la capacidad de unión IgE (**Figura 11**). Dado que el proceso de precipitación de alérgenos con acetona no afecta a los extractos, se seleccionó este último como método de purificación y concentración de alérgenos.

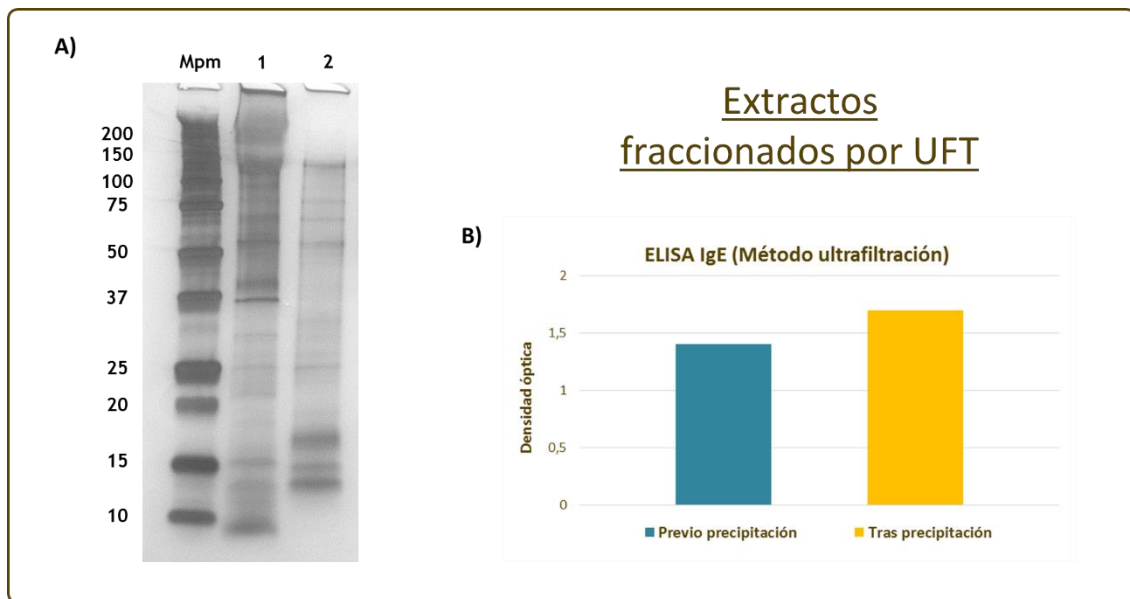


Figura 10: A) Perfil proteico de los extractos fraccionados por UFT: 1- Fracción >100 kDa; 2- Fracción <100 kDa; B) Capacidad de unión IgE (ELISA) de los extractos purificados por UFT. Mpm: marcador de peso molecular.

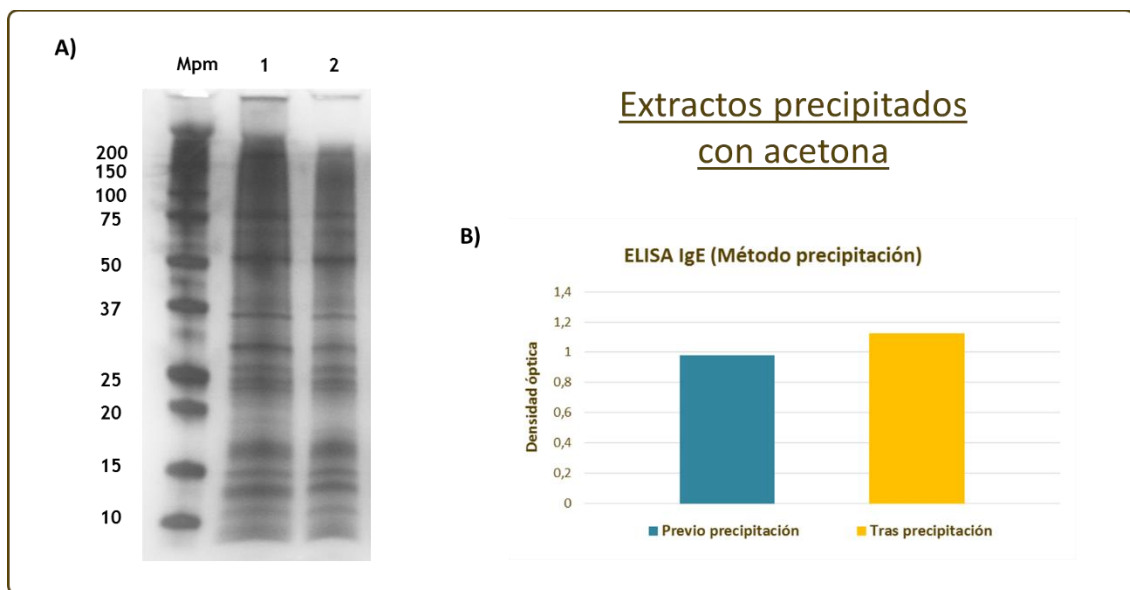


Figura 11: A) Perfil proteico de extractos nativos completos: 1- previo a la precipitación con acetona y 2- tras la precipitación con acetona. B) Capacidad de unión IgE (ELISA) de los extractos purificados por precipitación con acetona. Mpm: marcador de peso molecular.

Tabla 5: Alérgenos de *A. alternata*, aceptados por la WHO/IUIS, identificados mediante espectrometría de masas en las fracciones obtenidas por UFT.

Fracción >100kDa	Fracción <100kDa
Alt a 1	Alt a 1
Alt a 3	-
Alt a 4	-
Alt a 5	Alt a 5
Alt a 6	-
Alt a 7	-
Alt a 8	-
Alt a 10	Alt a 10
Alt a 12	Alt a 12
Alt a 14	Alt a 14
Alt a 15	Alt a 15

C. Polimerización de alérgenos. Optimización del proceso

Se analizó el contenido proteico de las 8 muestras (>100 kDa) obtenidas en la optimización de las condiciones de polimerización. Los extractos nativos incubados sin glutaraldehído (A y E) son los que presentaron una menor concentración de proteína. El mayor contenido en proteína se observó en los extractos tratados con mayor concentración de glutaraldehído (D y H) (**Tabla 6**).

Tabla 6: Concentración proteica de las muestras utilizadas en la optimización de la polimerización.

Concentración proteica (µg/ml)	
Diálisis agua	A: SIN GA 288,6
	B: GA 12,5 mM 399,6
	C: GA 25 mM 683,9
	D: GA 50 mM 1359
Diálisis PBS	E: SIN GA 307
	F: GA 12,5 mM 318,4
	G: GA 25 mM 592,4
	H: GA 50 mM 1195

Los perfiles proteicos y alergénicos mostraron la presencia de bandas de tamaño inferior a 100 kDa, detectándose en el SDS-PAGE un mayor número de bandas en las muestras A y E. Estas bandas fueron más evidentes en la muestra dializada frente agua (muestra A) que en la dializada frente PBS (muestra E) (**Figura 12**). En cuanto a las muestras tratadas con diferentes concentraciones de glutaraldehído, se observó que los perfiles presentaban una pérdida de las bandas de tamaño inferior a 100 kDa a medida que la cantidad de glutaraldehído adicionada fue mayor.

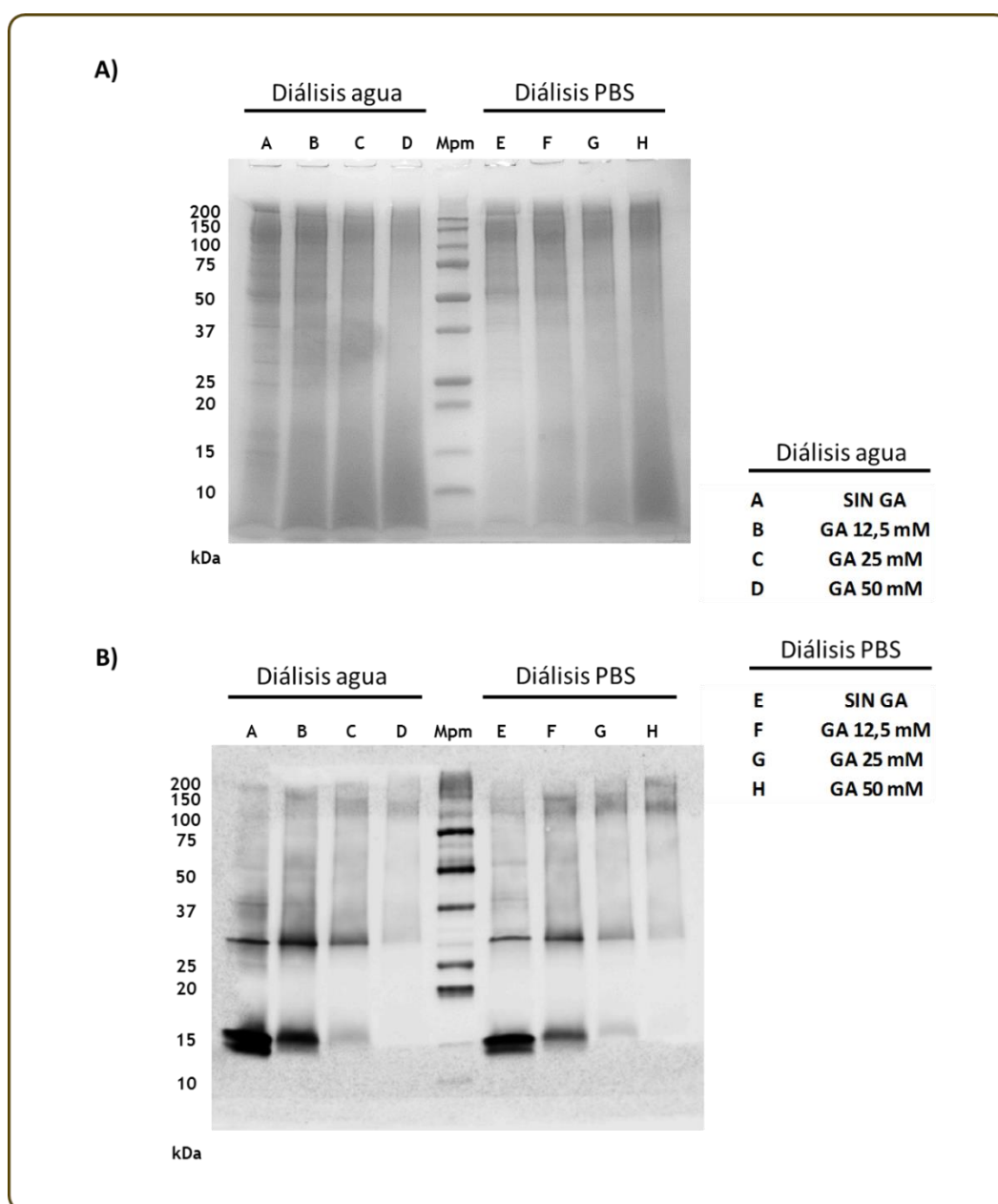


Figura 12: A) Perfil proteico y B) perfil alergénico de los ensayos de optimización de la polimerización. Mpm: marcador de peso molecular.

En los resultados de ELISA de competición (**Figura 13**), se observó en las muestras dializadas frente agua una pérdida paulatina de la potencia biológica a medida que la cantidad de glutaraldehído adicionada era mayor, respecto al extracto nativo control (sin tratamiento, incubaciones ni diálisis). La potencia disminuyó desde un 83,30% en la muestra sin glutaraldehído (A), hasta un 22,60% en la muestra de mayor concentración de glutaraldehído (D). En el caso de las muestras dializadas frente PBS, todas las muestras, incluido el extracto sin glutaraldehído, presentaron una pérdida de potencia superior al 70%, siendo la muestra tratada con mayor concentración de glutaraldehído (H) la que presentó la mayor disminución de potencia (84% de disminución). Durante el proceso de diálisis, también se pudo observar una pérdida de color de los extractos dializados frente PBS, respecto a los dializados frente a agua. Estos datos sugieren que la diálisis frente PBS permite una mejor eliminación de las moléculas no polimerizadas, y que concentraciones crecientes de glutaraldehído producen una disminución de la potencia biológica de los extractos.

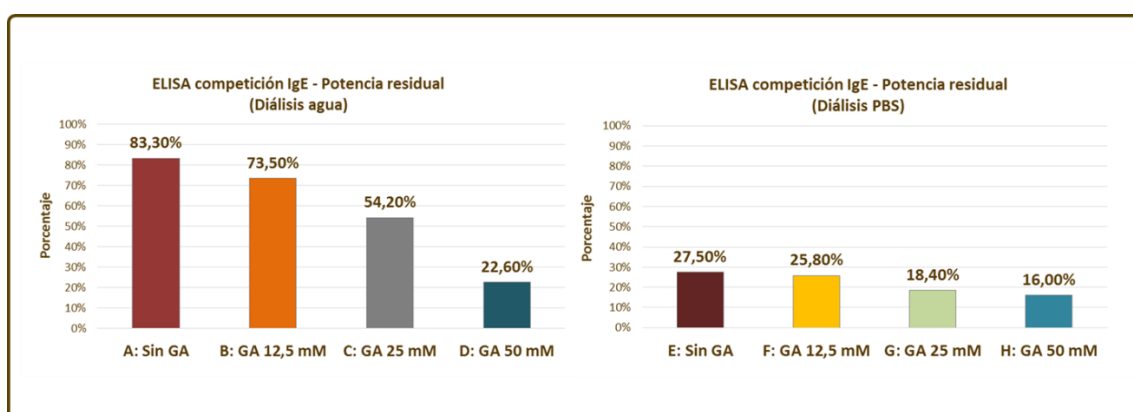


Figura 13: Potencia biológica IgE residual (ELISA de competición) de las muestras empleadas en la optimización de la polimerización, expresada en porcentaje respecto al extracto nativo original.

Así, se establecieron éstas como las condiciones óptimas para la polimerización de extractos alérgicos (GA 50 mM y diálisis frente PBS) y se procedió a la producción y caracterización de extractos polimerizados, dializados por UFT.

Una vez optimizadas las condiciones de polimerización, el proceso fue validado siguiendo la normativa EMA/CHMP/BWP/187338/2014 y se evaluó su reproducibilidad mediante la producción de 5 lotes y el análisis de su contenido en alérgeno principal (Alt a 1) y su potencia biológica.

En la **Tabla 7** se muestran los resultados de cuantificación del alérgeno principal, tanto en los extractos nativos como en los polimerizados. La mediana del contenido cuantificado en los extractos nativos fue de 23 µg/mg de proteína total, siendo 18 y 51 µg/mg de proteína total, los valores mínimo y máximo obtenidos, respectivamente. La mediana del contenido en los extractos polimerizados fue de 3,4 µg/mg de proteína total; los valores mínimo y máximo obtenidos fueron 1,3 y 3,8 µg/mg de proteína total, respectivamente.

Tabla 7. Contenido en Alt a 1 de los diferentes lotes de extracto nativo y polimerizado producidos.

Contenido en Alt a 1 de los extractos (µg Alt a 1/mg proteína total)		
	Extractos nativos	Extractos polimerizados
Lote 1	23	3,4
Lote 2	23	3,2
Lote 3	18	1,3
Lote 4	23	3,4
Lote 5	51	3,8

El valor de 50% de inhibición de un extracto indica la cantidad de proteína (en µg/ml) necesaria para producir la inhibición de la unión de anticuerpos (IgE o IgG) a las proteínas de otro extracto alergénico. Valores mayores de 50% de inhibición indican una menor potencia biológica. Los valores de 50% de inhibición obtenidos para los extractos nativos y polimerizados respecto al extracto nativo se muestran en la **Tabla 8**. Se observó una disminución media de la potencia biológica de los extractos polimerizados del $88,4\% \pm 1,2$ respecto a los extractos nativos. Estos resultados muestran que el proceso de polimerización es consistente entre lotes.

Tabla 8. Valores de 50% de inhibición de IgE específica (potencia biológica) de los extractos; los valores de potencia relativa y porcentaje de pérdida de potencia son referidos a los extractos polimerizados respecto los nativos.

	50% Inhibición IgE específica (µg/ml)		Potencia relativa	% Pérdida de potencia
	Extracto nativo	Extracto polimerizado		
Lote 1	0,046	0,344	7,4	87
Lote 2	0,031	0,272	8,7	89
Lote 3	0,035	0,342	9,8	90
Lote 4	0,018	0,165	9,2	89
Lote 5	0,040	0,298	7,4	87

D. Caracterización molecular de los extractos polimerizados

1. SDS-PAGE y *Western blot*

El perfil electroforético y alergénico del extracto polimerizado (>100 kDa) reveló la ausencia de las bandas de tamaño molecular inferior a 100 kDa, que se observan en el extracto nativo. En ambos perfiles se puede observar además la presencia de proteínas alergénicas en la región superior, correspondiente a tamaños moleculares superiores a 100 kDa, sugiriendo la polimerización de los alérgenos (**Figura 14**).

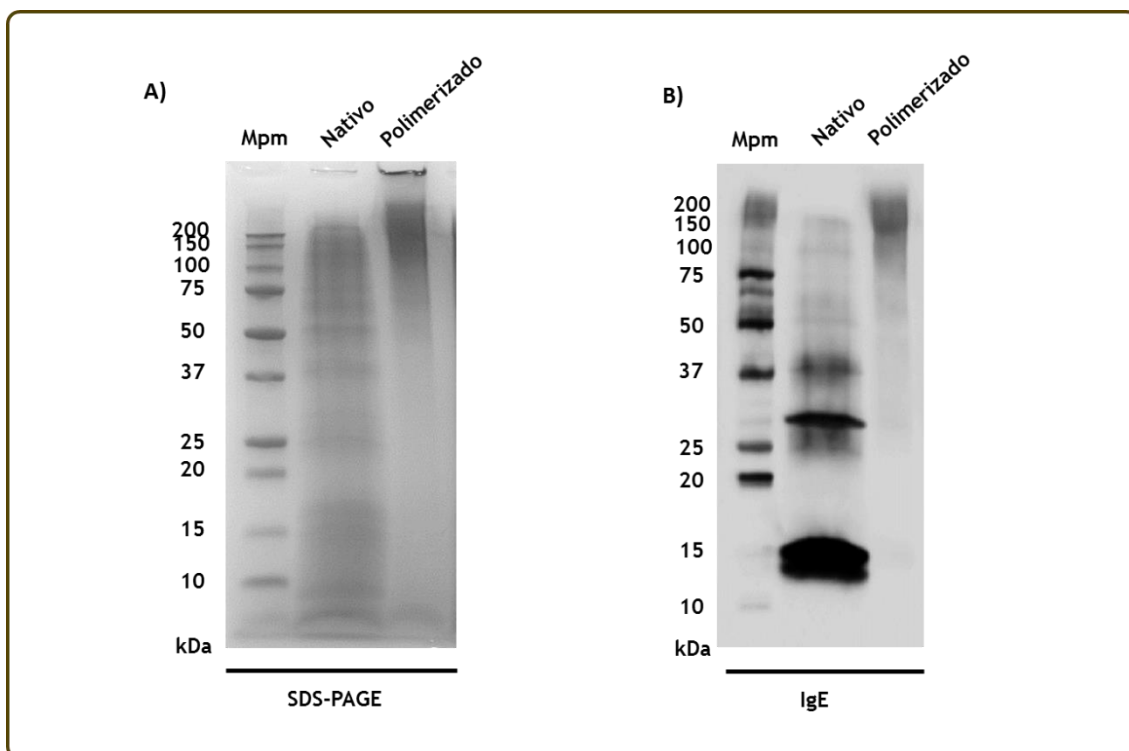


Figura 14: Perfil electroforético (A) y alergénico (B) de los extractos nativo y polimerizado. Mpm: marcador de peso molecular.

2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La **Figura 15** muestra los espectros monodimensionales de protón obtenidos por RMN DOSY del extracto nativo (**A**) y polimerizado (**B**), donde se representa el desplazamiento químico en ppm (δ , eje x) y el logaritmo del coeficiente de difusión en m^2/s (D , eje y). En la **Figura 16** se muestra la comparación de los espectros DOSY de ambos extractos (**A**) y de las proyecciones en el eje del logaritmo de D (**B**).

Según los resultados obtenidos, se pudo determinar que ambos tipos de extracto presentan un elevado contenido en carbohidratos (señal en la región $\delta=3,5-4,5$ ppm) y proteínas (zona alifática de alto campo, $\delta=0-2,5$ ppm, y aromática, $\delta=4,5-5,5$ ppm) (**Figura 15**). En el caso del extracto nativo, se detectó la presencia de 3 tipos de poblaciones moleculares, compuesta cada una por partículas con diferentes coeficientes de difusión (a, b y c). Las señales b y c corresponden con partículas de mayor radio hidrodinámico, compuestas por una parte proteica y otra de carbohidrato. El ancho de los picos observados en la proyección del coeficiente de difusión, indicó que se trata de dos poblaciones de

partículas heterogéneas (polidispersas) (**Figura 16B**). El espectro del extracto polimerizado mostró una única población de partículas, homogénea y de tamaño similar, compuesta por una fracción de carbohidratos y proteínas (**Figura 15B**).

Al comparar los resultados de ambos extractos, se observó que el coeficiente de difusión de la población del polimerizado (en rojo) era superior a las poblaciones halladas en el nativo (**Figura 16A**); este dato indica que el radio hidrodinámico de esta población es mayor, sugiriendo un mayor tamaño molecular.

La comparación de los valores de coeficiente de difusión obtenidos para cada población de partículas con los estándares de polisacáridos y sulfato de poliestireno permitió estimar el peso molecular de éstas. Los rangos de peso molecular obtenidos se muestran en la **Tabla 9**. Dado que los extractos se componen de una mezcla de moléculas de diversa naturaleza, los valores de peso molecular sólo pueden considerarse como una aproximación, no como valores exactos.

Estos resultados indican que ambos extractos presentan una composición proteica y de carbohidratos similar y que el extracto polimerizado está compuesto por una población de moléculas de mayor tamaño molecular que las poblaciones detectadas en el nativo. Estos datos sugieren que las moléculas han polimerizado en presencia del glutaraldehído.

Tabla 9: Rangos de peso molecular correspondientes a los valores de D obtenidos por DOSY.

	NATIVO			POLIMERIZADO
	Población <i>a</i>	Población <i>b</i>	Población <i>c</i>	Única población
D (cm²/s)	5,06E-06	1,29E-06	4,26E-07	2,78E-07
Rango PM (kDa)	<1	5±2	40±5	95±10

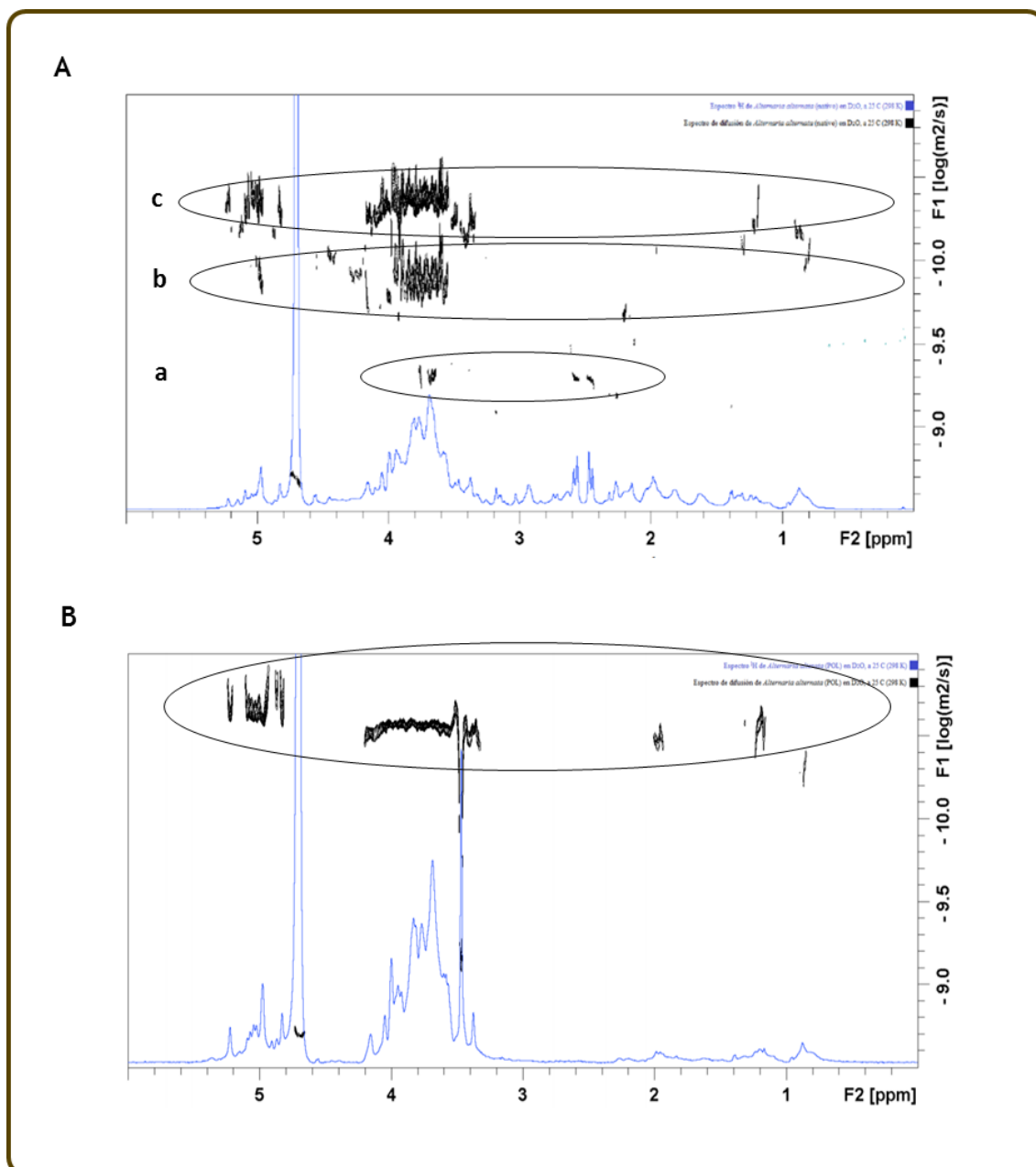


Figura 15: Solapamiento de los espectros monodimensionales (en azul) con sus correspondientes espectros DOSY (en negro), de los extracto nativo (A) y polimerizado (B). El eje y corresponde al logaritmo del coeficiente de difusión (valores más negativos indican un menor coeficiente de difusión, correspondiendo con un mayor radio hidrodinámico).

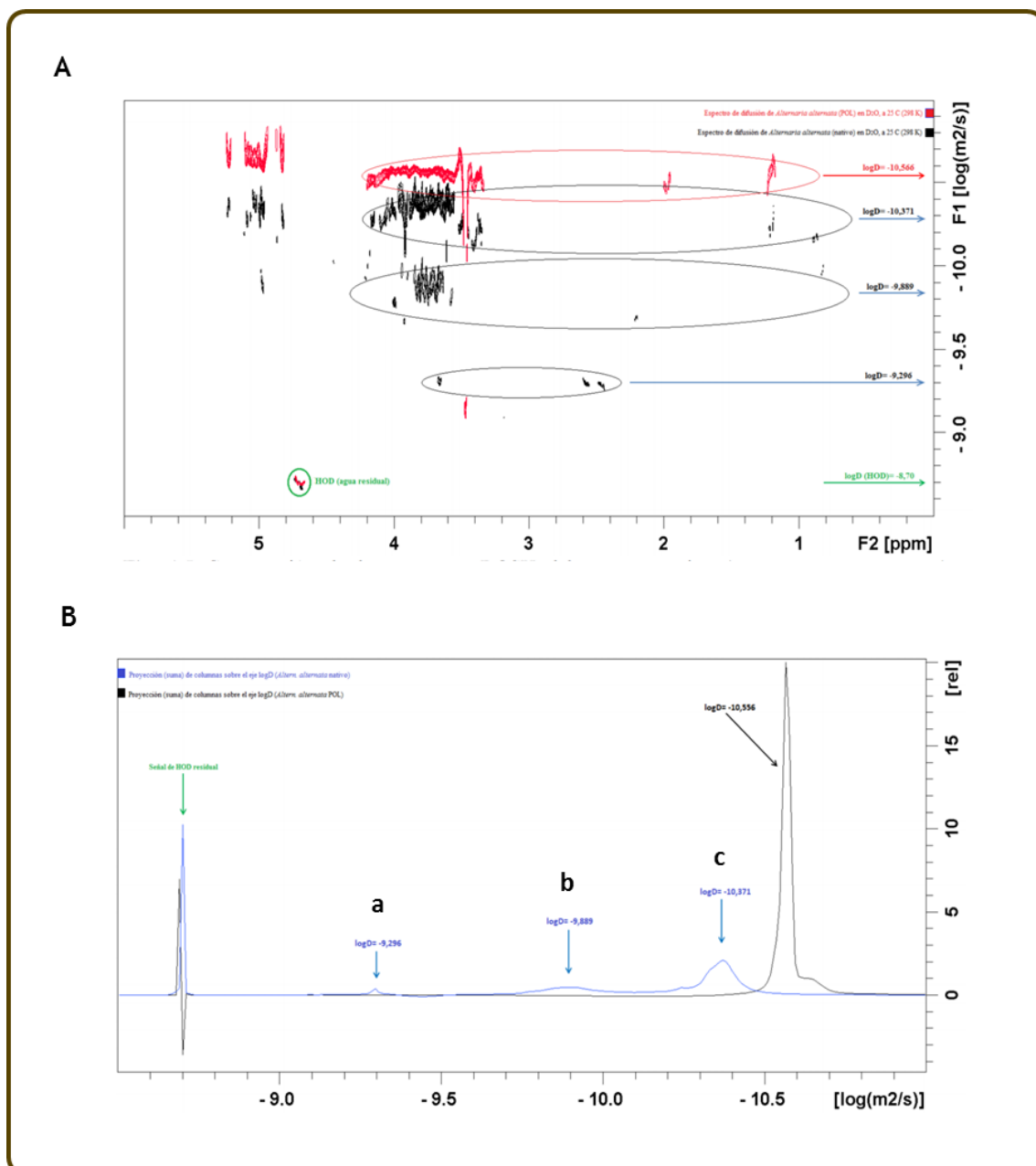


Figura 16: A) Comparación de los espectros DOSY de los extractos nativo (negro) y polimerizado (rojo). B) Comparación de los diagramas de las proyecciones del logaritmo del coeficiente de difusión de los extractos nativo (azul) y polimerizado (negro). La escala del eje y indica la abundancia relativa de las distintas especies de la muestra. El ancho de los picos corresponde con la homogeneidad (dispersidad) de las poblaciones.

3. Análisis de aminoácidos y reacción con fluorescamina (Fluram)

El glutaraldehído reacciona de forma irreversible con las proteínas a través de los grupos amino de los aminoácidos, principalmente de lisinas y argininas, asparagina/aspartato y glutamina/glutamato. Se analizó y comparó el contenido en aminoácidos de los extractos nativo y polimerizado, obtenido mediante cromatografía de gases (**Figura 17**). Se observó en el polimerizado una disminución en el porcentaje de composición molar de los residuos de lisina y arginina de 6,01 a 0,75 (87,5%) y de 1,75 a 0,93 (46,9%), respectivamente, en comparación con el extracto nativo; el porcentaje de detección de residuos de asparagina/aspartato y glutamina/glutamato se redujo de 25,58 a 5,91 (76,9%) y de 22,71 a 5,47 (75,9%), respectivamente. Además, se analizaron los resultados obtenidos mediante reacción con fluorescamina (Fluram), observándose un 90,6% de disminución en la detección de grupos amino primarios libres en los extractos polimerizados, respecto al extracto nativo.

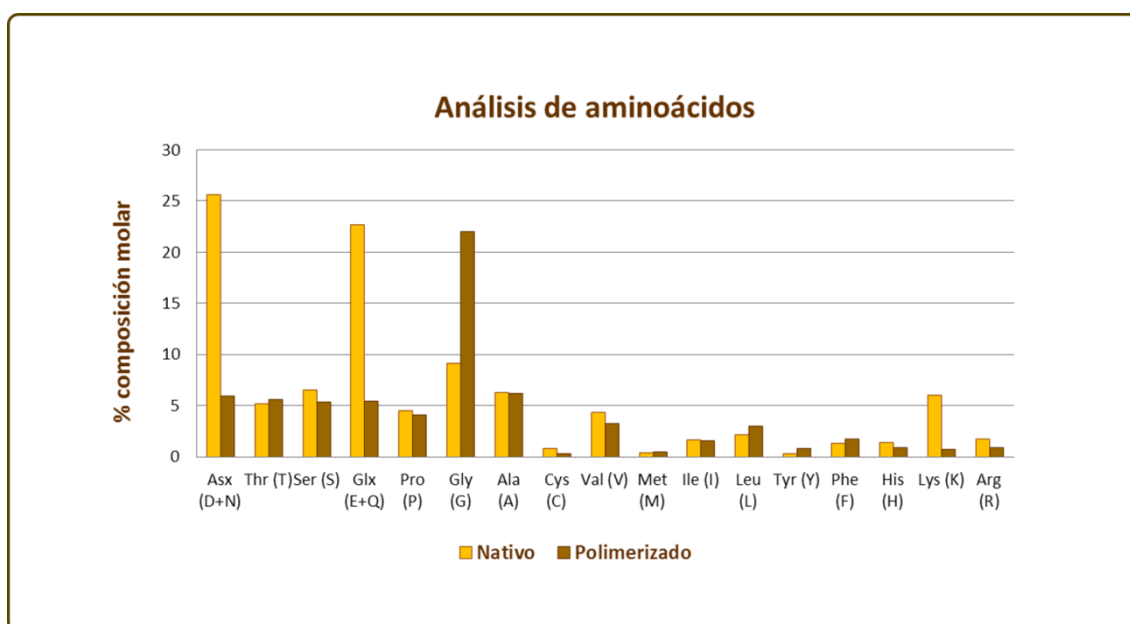


Figura 17: Porcentaje de composición molar de aminoácidos en los extractos; se observa una disminución del contenido en lisinas (87,5%), argininas (46,9%), asparagina/aspartato (76,9%) y glutamina/glutamato (75,9%) en el extracto polimerizado, respecto al extracto nativo

Estos resultados sugieren que el GA se ha unido de forma efectiva a los aminoácidos, pudiendo haber producido el entrecruzamiento de las proteínas, y por tanto, la formación de polímeros proteicos.

4. Identificación de proteínas mediante LC-MS/MS

De las más de 1.000 proteínas identificadas en los extractos, se seleccionaron aquellas proteínas identificadas con, al menos, dos péptidos y con un *protein-score* mínimo de 20 y se contrastó con la base de datos de la WHO/IUIS. Entre estas, fueron identificados los alérgenos de *A. alternata*: Alt a 1, Alt a 10, Alt a 14, Alt a 15, tanto en el extracto nativo como en el polimerizado (**Tabla 10**). El alérgeno Alt a 14 fue identificado en el extracto polimerizado con un único péptido, aunque con un *protein-score* de 26. La relación de proteínas obtenidas tras LC-MS/MS no reveló la identificación de otros alérgenos registrados en la WHO/IUIS.

El alérgeno principal, Alt a 1, fue identificado en el extracto nativo con dos nombres y números de acceso diferentes, que a su vez diferían del identificado en el extracto polimerizado. Igualmente, los alérgenos Alt a 10 y Alt a 15 fueron identificados en el extracto nativo con un número de acceso diferente al obtenido en el análisis del extracto polimerizado. Las secuencias de aminoácidos de estos alérgenos presentaron un 100% de homología con las secuencias registradas en la WHO/IUIS, concluyéndose que estos alérgenos se encuentran presentes en ambos tipos de extracto. Las diferencias en el nombre y número de acceso de un mismo alérgeno se deben a la forma en que las secuencias son registradas en las bases de datos de proteínas, pudiendo registrarse parte de la secuencia de una proteína (una subunidad, por ejemplo) o secuencias obtenidas a partir de diferentes fuentes, donde pueden existir o no, diferencias entre bases, sin que ello implique una diferente función o proteína.

En la **Tabla 11** se recogen todas las proteínas identificadas en el extracto nativo cuya función es homóloga a la de otros alérgenos incluidos en las bases de datos (*Allergome* y WHO/IUIS), pertenecientes o no al género *Alternaria*. De las 33 proteínas identificadas, 24 han sido descritas o propuestas como alérgenos en

algún hongo, como los del género *Aspergillus*, *Cladosporium* o *Fusarium*; entre estas 33 proteínas se encuentran además proteínas de ácaros, plantas, alimentos e, incluso, 2 de ellas (manganeso superóxido dismutasa y transaldolasa) se encuentran registradas en la base de datos *Allergome* como posibles alérgenos en humanos (autoalérgenos). De estas proteínas, se seleccionaron aquellas con función homóloga a alérgenos incluidos en la base de datos de la WHO/IUIS. Esta selección se recoge en la **Tabla 12**, así como los porcentajes de similitud e identidad obtenidos tras el alineamiento de sus secuencias con las de los alérgenos descritos. En todos los casos se obtuvo un porcentaje de similitud superior al 50%, a excepción de la fosfolipasa A2 de *Apis cerana* (47,6%) y la transaldolasa de *Cladosporium cladosporioides* (48,3%).

Tabla 10. Alérgenos de *A. alternata* identificados en los extractos mediante LC-MS/MS.

Número acceso NCBI	Proteína identificada en extracto nativo	Incluido como alérgeno de <i>Alternaria</i> en IUIS	Identificada en extracto polimerizado
gi 1027161883	Aldehyde dehydrogenase	Alt a 10	gi 76666767
gi 815836346	Alt a1 major allergen, partial	Alt a 1	gi 1773369 (Allergen Alt a I subunit)
gi 390980892	Chain A, Crystal Structure Of <i>Alternaria Alternata</i> Allergen Alt A 1	Alt a 1	
gi 529279957	Manganese superoxide dismutase	Alt a 14	Sí
gi 1027156205	Subtilisin-like serine protease	Alt a 15	gi 636530596 (subtilisin-like serine protease, partial)

Tabla 11. Proteínas identificadas en los extractos mediante LC-MS/MS, incluidas como alérgenos en alguna fuente alérgica en las bases de datos de *Allergome* y/o de la WHO/IUIS. (¹Identificados con un solo péptido).

Proteína identificada en extracto nativo	Incluido como alérgeno en otras fuentes en <i>Allergome</i>	Incluido como alérgeno en otras fuentes en <i>IUIS</i>	Identificada en extracto polimerizado
Alcohol oxidase	<i>Aspergillus fumigatus</i> (Asp f IAO)	<i>FAD-containing oxidase</i> : Api g 5 <i>Alcohol dehydrogenase</i> : Cand a 1	Sí
Aldehyde dehydrogenase	<i>Alternaria</i> (Alt a 10) Otros hongos, Insectos, Ácaros, Crustáceos, Plantas, Frutas, Látex	Alt a 10, Cla h 10, Har a 2, Tyr p 35	Sí
Aldolase	Hongos, Aves, Peces, Parásitos, Frutas, Plantas, Insectos, Crustáceos	<i>Transaldolase</i> : Cla c 14, Pen ch 35, Fus p 4 <i>Aldolase</i> : Gad m 3, Gal d 10, Sal s 3, Thu a 3	¹ Sí
Alpha-amylase	Hongos, Bacterias, Ácaros, Plantas, Insectos	Bla g 11, Der f 4, Eur m 4, Hor v 16	NO
Alpha-glucosidase-like protein	(<i>Glucosidase</i>) Hongos, Plantas	α - <i>glucosidase</i> : Aed a 4	Sí
Arabinanase/levansucrase/invertase	(<i>Invertase</i>) Platanus, Hongos	NO	NO
Asp f 13-like protein	<i>Aspergillus</i>	NO	NO
Asparaginase/glutaminase	Bacterias	NO	¹ Sí
Beta glucosidase	(<i>Glucosidase</i>) Hongos, Plantas	NO	¹ Sí
Beta-galactosidase	<i>Aspergillus</i> , <i>Phoenix dactylifera</i> , Bacterias	NO	Sí
Carbonic anhydrase	Vaca	NO	Sí
Carboxylesterase-like protein	(<i>Carboxylase</i>) Abeja	<i>Carboxylesterase</i> : Api m 8	NO
Liver carboxylesterase 1 precursor			¹ Sí
Chitin binding protein	Ácaros, Plantas, Látex	Der f 18, Der p 18	Sí
Covalently-linked cell wall protein	Hongos	NO	NO
Esterase	<i>Aspergillus</i> (Asp sp PME) Alimentos, Insectos, Perro, Plantas, Látex	Hev b 13 <i>Pectin methylesterase</i> : Act d 7, Ole e 11, Sal k 1 <i>Carboxylesterase</i> : Api m 8 <i>Arginine esterase</i> : Can f 5	NO

Tabla 11 (Cont.). Proteínas identificadas en los extractos mediante LC-MS/MS, incluidas como alérgenos en alguna fuente alérgica en las bases de datos de *Allergome* y/o de la WHO/IUIS. (¹Identificados con un solo péptido).

Proteína identificada en extracto nativo	Incluido como alérgeno en otras fuentes en <i>Allergome</i>	Incluido como alérgeno en otras fuentes en IUIS	Identificada en extracto polimerizado
Exo-beta 1,3 glucanase	Hongos	Hev b 2, Mus a 5, Ole e 9	Sí
Formate dehydrogenase	<i>Aspergillus</i> (Asp f FDH), <i>Candida</i>	NO	Sí
Glucan 1,3-beta-glucosidase-like protein	Hongos	NO	Sí
Heat shock protein 70	<i>Alternaria</i> (Alt a 3) Otros hongos, Mosquito, Avispa, Parásitos, Ácaros, Plantas	Alt a 3, Aed a 8, Der f 28, Mala s 10, Pen c 19, Tyr p 28	¹ Sí
Laccase	Hongos (<i>Myceliophthora</i>)	NO	NO
Malate dehydrogenase	<i>Aspergillus</i> , <i>Malassezia</i> , Sandía	NO	NO
Manganese superoxide dismutase	<i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Malassezia</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Curvularia</i> , Látex, Pistacho, Humano, Gramíneas	Alt a 14, Asp f 6, Hev b 10, Mala s 11, Pis v 4	¹ Sí
Metallo-hydrolase/oxidoreductase	(<i>Oxidoreductase</i>) <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Malassezia</i> (Mala s 13) Ácaros, Crustáceos, Gramíneas, Bacterias	<i>Oxidoreductase</i> : Mala s 12	¹ Sí
Nucleoside diphosphate kinase-like protein	Peces	NO	Sí
Phospholipase A2	Abeja, Avispa	Api c 1, Api d 1, Api m 1, Bom p 1, Bom t 1	NO

Tabla 11 (Cont.). Proteínas identificadas en los extractos mediante LC-MS/MS, incluidas como alérgenos en alguna fuente alérgica en las bases de datos de *Allergome* y/o de la WHO/IUIS. (¹Identificados con un solo péptido).

Proteína identificada en extracto nativo	Incluido como alérgeno en otras fuentes en <i>Allergome</i>	Incluido como alérgeno en otras fuentes en <i>IUIS</i>	Identificada en extracto polimerizado
Putative alpha/beta superfamily hydrolase	Hongos <i>Alternaria</i> (Alt a 13)	NO	¹ Sí
Putative glutathione-S-transferase theta, GST	Otros hongos, Ácaros, Insectos, Parásitos, Bacterias, Gramíneas	Alt a 13, Asc l 13, Asc s 13, Bla g 5, Blo t 8, Der f 8, Der p 8	NO
Ribonuclease T2	<i>Betula</i>	NO	NO
Subtilisin-like serine protease	<i>Alternaria</i> (Alt a 15) Otros hongos, Ácaros, Parásitos, Insectos, Plantas	Alt a 15	¹ Sí
Thioredoxin-like protein	(Thioredoxin) <i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Malassezia</i> , <i>Curvularia</i> Látex, Gramíneas, Maíz, Cucaracha	Thioredoxin: Asp f 28/29, Fus c 2, Mala s 13, Zea m 25	Sí
Transaldolase 1	<i>Fusarium</i> (Fus p 4), <i>Cladosporium</i> (Cla c 14), <i>Penicillium</i> (Pen ch 35) Humano	Fus p 4, Cla c 14, Pen ch 35	¹ Sí
Trypsin precursor	(Trypsin) Ácaros, Plantas, Alimentos, Insectos	Trypsin: Blo t 3, Der f 3, Der p 3, Eur m 3, Tyr p 3	Sí
Zinc carboxypeptidase A 1 precursor	(Serine carboxypeptidase) Levaduras, Abeja	Serine carboxypeptidase: Api m 9	Sí

Tabla 12. Porcentajes de similitud de secuencia e identidad entre proteínas potencialmente alergénicas por su homología de función con alérgenos incluidos en la base de datos de la WHO/IUIS.

Proteína identificada en extracto nativo	Incluido como alérgeno en IUIS	% Similitud de secuencia	% Identidad de secuencia
Alcohol oxidase	<i>FAD-containing oxidase</i> : Api g 5	Api g 5: 52,4%	Api g 5: 23,8%
	<i>Alcohol dehydrogenase</i> : Cand a 1	Cand a 1: 68,1%	Cand a 1: 29,8%
Aldehyde dehydrogenase	Alt a 10, Cla h 10, Har a 2, Tyr p 35	Cla h 10: 93,8%	Cla h 10: 80,3%
		Har a 2: 61,3%	Har a 2: 30,9%
Aldolase	Transaldolase: Cla c 14, Pen ch 35, Fus p 4	Tyr p 35: 76,9%	Tyr p 35: 51,7%
		Cla c 14: 48,3%	Cla c 14: 28,3%
	Aldolase: Gal d 10, Sal s 3, Thu a 3	Pen ch 35: 59,7%	Pen ch 35: 32,3%
		Fus p 4: 53,6%	Fus p 4: 27,4%
		Gal d 10: 54,0%	Gal d 10: 28,0%
Alpha-amylase	Bla g 11, Der f 4, Eur m 4	Sal s 3: 53,2%	Sal s 3: 29,8%
		Bla g 11: 55,4%	Bla g 11: 24,0%
		Der f 4: 52,5%	Der f 4: 23,2%
Alpha-glucosidase-like protein	α -glucosidase: Aed a 4	Eur m 4: 52,3%	Eur m 4: 21,6%
		Aed a 4: 54,5%	Aed a 4: 36,4%
		Api m 8: 57,6%	Api m 8: 29,7%
Carboxylesterase-like protein	Carboxylesterase: Api m 8	Api m 8: 55,3%	Api m 8: 31,6%
		Der f 18: 54,5%	Der f 18: 22,0%
		Der p 18: 63,6%	Der p 18: 40,9%
Liver carboxylesterase 1 precursor	Der f 18, Der p 18 Hev b 13	Hev b 13: 47,7%	Hev b 13: 24,2%
		Act d 7: 60,0%	Act d 7: 28,10%
		Ole e 11: 58,8%	Ole e 11: 19,6%
Chitin binding protein	Pectin methylesterase: Act d 7, Ole e 11, Sal k 1	Sal k 1: 63,0%	Sal k 1: 30,4%
		Api m 8: 65,5%	Api m 8: 37,9%
		Can f 5: 50,6%	Can f 5: 21,8%
Esterase	Carboxylesterase: Api m 8 Arginine esterase: Can f 5	Hev b 2: 60,4%	Hev b 2: 22,9%
		Ole e 9: 60,0%	Ole e 9: 43,3%
Exo-beta 1,3 glucanase	Hev b 2, Mus a 5, Ole e 9		

Tabla 12 (Cont.). Porcentajes de similitud de secuencia e identidad entre proteínas potencialmente alergénicas por su homología de función con alérgenos incluidos en la base de datos de la WHO/IUIS.

Proteína identificada en extracto nativo	Incluido como alérgeno en IUIS	% Similitud de secuencia	% Identidad de secuencia
Heat shock protein 70	Alt a 3, Aed a 8, Der f 28, Mala s 10, Pen c 19, Tyr p 28	Mala s 10: 59,2% Pen c 19: 77,6% Aed a 8: 78,5% Der f 28: 78,5% Tyr p 28: 80,0%	Mala s 10: 26,1% Pen c 19: 47,2% Aed a 8: 49,0% Der f 28: 47,1% Tyr p 28: 51,6%
Manganese superoxide dismutase	Alt a 14, Asp f 6, Hev b 10, Mala s 11, Pis v 4	Asp f 6: 83,0% Hev b 10: 74,3% Mala s 11: 77,3% Pis v 4: 73,7%	Asp f 6: 59,0% Hev b 10: 47,5% Mala s 11: 48,3% Pis v 4: 47,5%
Metallo-hydrolase/oxidoreductase	Oxidoreductase: Mala s 12	Mala s 12: 52,1%	Mala s 12: 35,4%
Phospholipase A2	Api c 1, Api d 1, Api m 1, Bom p 1, Bom t 1	Api c 1: 47,6% Api d 1: 72,7% Api m 1: 72,7% Bom p 1: 64,5% Bom t 1: 73,9%	Api c 1: 28,6% Api d 1: 36,4% Api m 1: 45,5% Bom p 1: 22,6% Bom t 1: 26,1%
Putative glutathione-S-transferase theta, GST	Alt a 13, Asc l 13, Asc s 13, Bla g 5, Blo t 8, Der f 8, Der p 8	Asc l 13: 50,0% Asc s 13: 50,0% Bla g 5: 51,5% Blo t 8: 54,2% Der f 8: 50,3% Der p 8: 52,2%	Asc l 13: 24,7% Asc s 13: 24,7% Bla g 5: 20,5% Blo t 8: 21,1% Der f 8: 21,7% Der p 8: 19,1%

Tabla 12 (Cont.). Porcentajes de similitud de secuencia e identidad entre proteínas potencialmente alergénicas por su homología de función con alérgenos incluidos en la base de datos de la WHO/IUIS.

Proteína identificada en extracto nativo	Incluido como alérgeno en IUIS	% Similitud de secuencia	% Identidad de secuencia
Subtilisin-like serine protease	Alt a 15, Cur l 4, Api m 9, Cuc m 1	Alt a 15: 99% Cur l 4: 98,2% Cuc m 1: 63,8% Api m 9: 53,3%	Alt a 15: 98,6% Cur l 4: 90,7% Cuc m 1: 37,9% Api m 9: 24,3%
Thioredoxin-like protein	<i>Thioredoxin</i> : Asp f 28, Asp f 29, Fus c 2, Mala s 13, Zea m 25	Asp f 28: 91,7% Asp f 29: 58,3% Fus c 2: 64,0% Mala s 13: 65,4% Zea m 25: 53,7%	Asp f 28: 33,3% Asp f 29: 37,5% Fus c 2: 28,0% Mala s 13: 38,5% Zea m 25: 24,4%
Transaldolase 1	Fus p 4, Cla c 14, Pen ch 35	Fus p 4: 92,5% Cla c 14: 91,1% Pen ch 35: 91,7%	Fus p 4: 76,4% Cla c 14: 79,7% Pen ch 35: 75,9%
Trypsin precursor	<i>Trypsin</i> : Blo t 3, Der f 3, Der p 3, Eur m 3, Tyr p 3	Blo t 3: 74,8% Der f 3: 70,2% Der p 3: 70,7% Eur m 3: 72,6% Tyr p 3: 72,4%	Blo t 3: 46,1% Der f 3: 42,0% Der p 3: 42,2% Eur m 3: 41,4% Tyr p 3: 44,3%
Zinc carboxypeptidase A 1 precursor	<i>Serine carboxypeptidase</i> : Api m 9	Api m 9: 53,7%	Api m 9: 20,6%

5. Identificación de carbohidratos

El análisis de carbohidratos realizado mediante cromatografía de gases reveló que los monosacáridos predominantes en los extractos fueron la manosa, la glucosa y la galactosa, tanto en el extracto nativo como en el polimerizado, mientras que la glucosamina, la xilosa, la arabinosa y la ramnosa representaron el menor porcentaje respecto al total de carbohidratos (**Figura 18**).

Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos por RMN, donde se detecta un elevado contenido en carbohidratos, indicando que el componente de carbohidratos se mantiene en el extracto polimerizado.

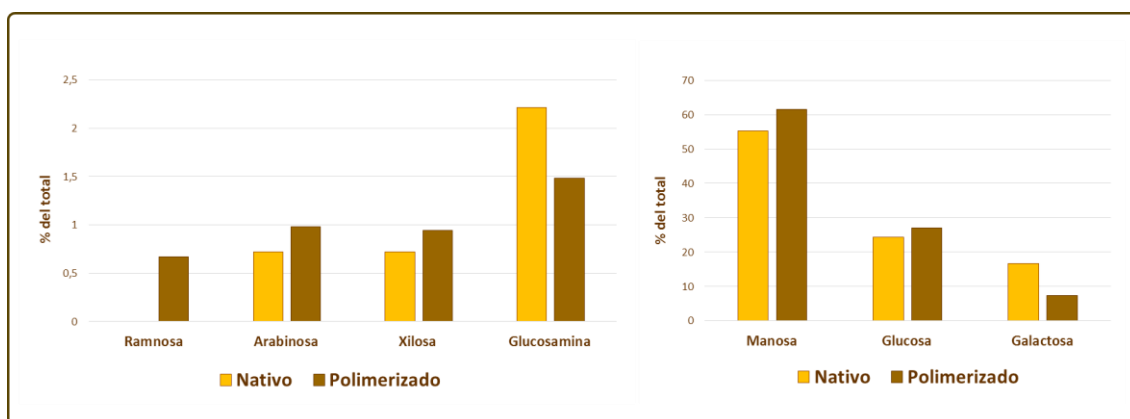


Figura 18: Porcentaje de monosacáridos detectados en los extractos nativo y polimerizado, mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas.

E. Caracterización inmunológica de los extractos polimerizados

1. ELISA de competición

En la **Figura 19** se muestran los resultados de ELISA de competición IgE e IgG de los extractos nativo y polimerizado obtenidos. Los valores de 50% de inhibición representan la cantidad de proteína necesaria de un extracto determinado para producir la inhibición de la unión de anticuerpos (IgE o IgG) a las proteínas de otro extracto alergénico. A partir de estos datos se pudo determinar que la pérdida de alergenicidad (capacidad de unión IgE específica) en el extracto polimerizado, respecto al extracto nativo, fue de un 87%. La capacidad inmunogénica (capacidad de unión IgG) del extracto polimerizado se mantuvo en un rango similar al del nativo.

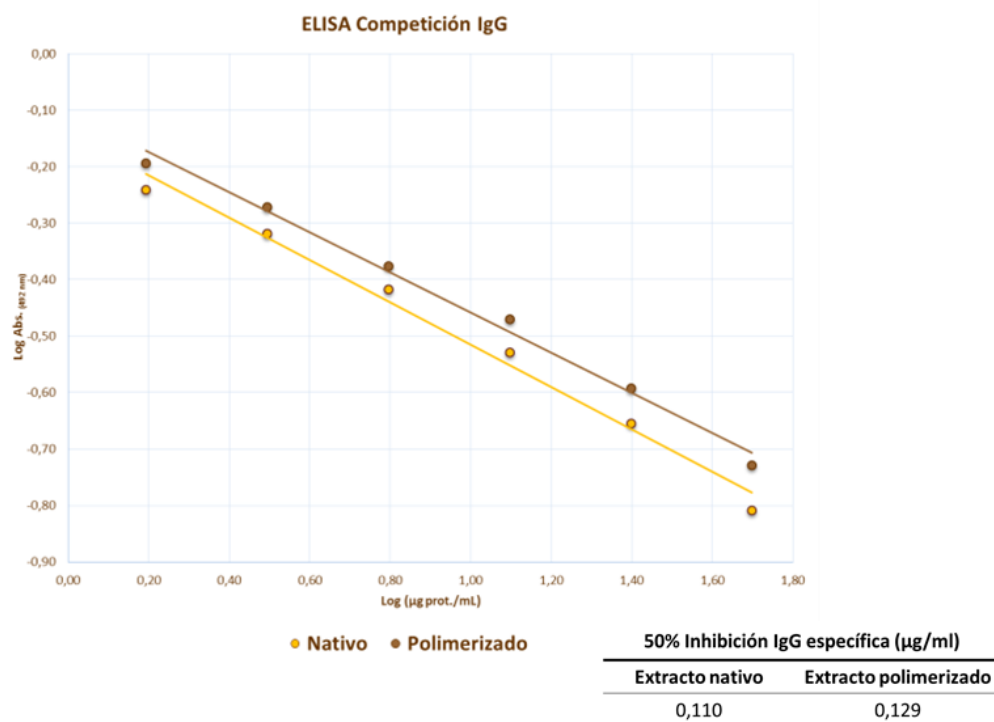
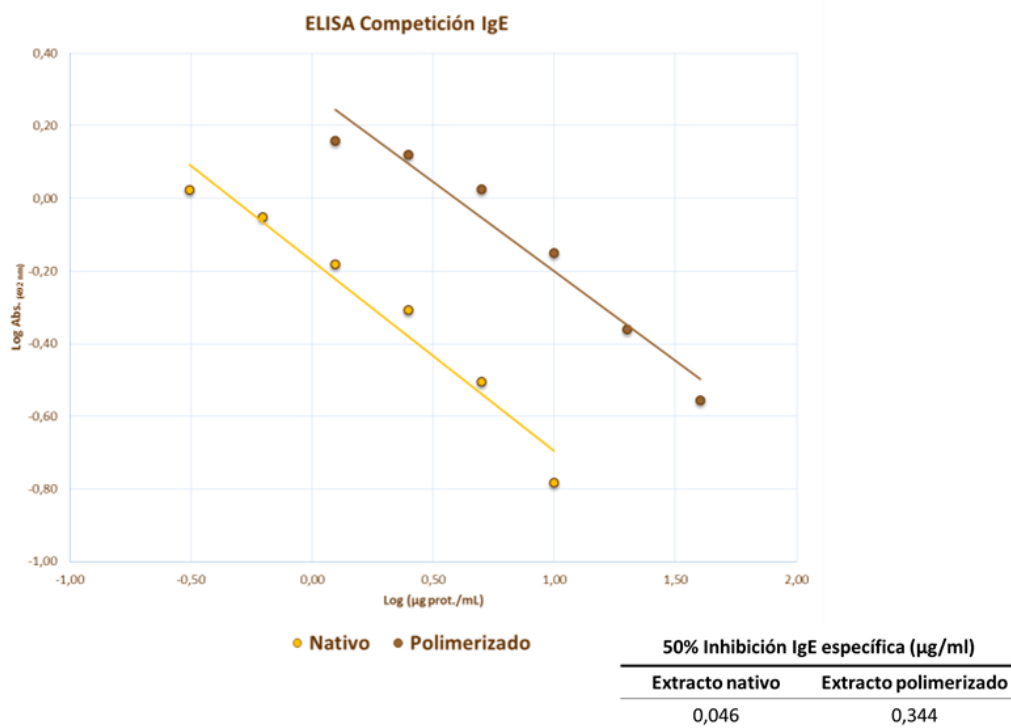


Figura 19: Representación gráfica de los resultados de ELISA de competición IgE e IgG de los extractos nativo y polimerizado. Las tablas muestran los resultados de 50% de inhibición obtenidos para cada extracto (en µg/ml).

2. Pruebas cutáneas

La **Tabla 13** muestra los datos epidemiológicos de los pacientes y el área de las pápulas (en mm²) inducidas por el extracto polimerizado y los correspondientes nativos a distintas concentraciones de Alt a 1.

Los resultados mostraron una reducción de la mediana del tamaño del área de la pápula del polimerizado (de concentración equivalente a la concentración del extracto nativo con 10 µg/ml de Alt a 1), respecto cada una de las concentraciones de su correspondiente nativo:

- Reducción respecto Nativo 10 µg/ml Alt a 1: 73% ($p < 0,0001$)
- Reducción respecto Nativo 2,5 µg/ml Alt a 1: 48% ($p = 0,005$)
- Reducción respecto Nativo 1 µg/ml Alt a 1: 44% ($p = 0,049$)

Tabla 13: Datos epidemiológicos y área de las pápulas.

Paciente	Sexo	Edad	Tamaño de la pápula (mm ²)			Polimerizado
			Nativo (10 µg/ml Alt a 1)	Nativo (2,5 µg/ml Alt a 1)	Nativo (1 µg/ml Alt a 1)	
1	Hombre	14	22,4	13,3	11,6	4,3
2	Hombre	13	11,1	1,1	2,6	7,6
3	Mujer	10	20,2	29,6	11,7	8,4
4	Mujer	7	15,1	7,0	8,0	4,1
5	Mujer	11	10,4	6,9	7,9	4,1
6	Hombre	13	22,5	9,4	9,3	5,1
7	Hombre	13	25,4	9,8	8,0	4,6
8	Mujer	11	8,0	7,6	8,9	4,9
9	Mujer	7	15,2	5,8	3,7	4,9
10	Mujer	10	21,1	29,4	12,9	8,7
11	Hombre	14	6,8	3,1	3,3	5,9
12	Hombre	14	20,3	11,3	11,4	4,1
13	Mujer	15	14,1	5,5	2,6	4,5
14	Hombre	13	11,2	9,8	7,6	12,7
15	Mujer	36	51,8	33,6	18,8	6,5
16	Hombre	27	51,8	9,8	10,2	9,5
17	Hombre	26	25,3	21,8	28,7	12,9
18	Hombre	28	52,1	56,6	27,8	25,1
19	Mujer	25	18,5	1,0	1,0	1,0
20	Hombre	43	24,1	20,1	20,1	1,0
21	Mujer	19	48,2	26,6	31,5	23,2
22	Mujer	23	34,8	30	20,9	7,9
23	Mujer	36	16,5	31,6	19,2	1,1
24	Mujer	30	8,7	16,1	7,7	11,7
Media ± IC 95%		19 ± 4	23,2 ± 5,8	16,5 ± 5,4	12,3 ± 3,4	7,7 ± 2,5
Desviación estándar		10	14,3	13,5	8,6	6,1
Mediana		14	20,3	10,6	9,8	5,5
Primer cuartil		13	13,4	7,0	7,7	4,3
Tercer cuartil		26	25,3	27,3	18,9	8,9
Máximo		43	52,1	56,6	18,9	25,1
Mínimo		7	6,8	1,0	31,5	1,0
N				24		
Hombres				11		
Mujeres				13		

La recta de regresión dosis-respuesta (**Figura 20**) que relaciona el tamaño de pápula inducido por cada una de las concentraciones de extracto nativo mostró una buena linealidad y ajuste ($r^2 = 0,99$); a partir de la ecuación de la

recta se obtuvo que el extracto polimerizado a una concentración de 10 µg/ml de Alt a 1 (teórica) induce un tamaño de pápula equivalente al producido por el extracto nativo a una concentración de 0,169 µg/ml de Alt a 1, indicando una pérdida de alergenicidad del extracto polimerizado.

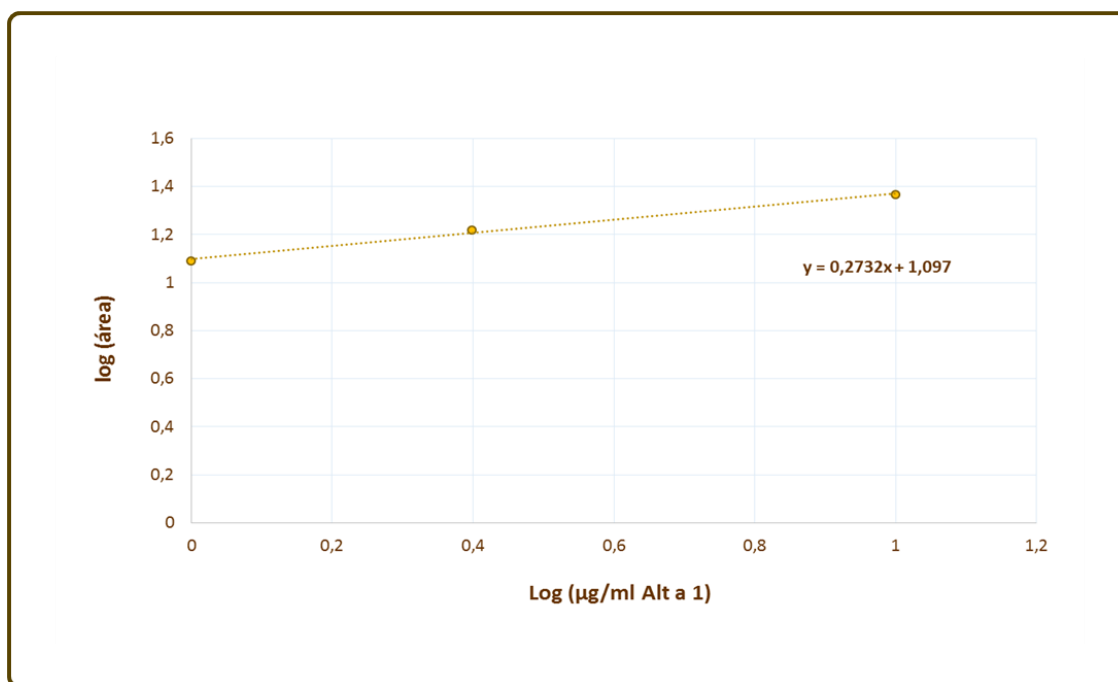


Figura 20: Representación gráfica de los resultados de ELISA de competición IgE e IgG de los extractos nativo y polimerizado. Las tablas muestran los resultados de 50% de inhibición obtenidos para cada extracto (en µg/ml).

3. Análisis de la actividad enzimática

De los 19 tipos de actividad enzimática evaluados de forma cualitativa, mediante la utilización de galerías comerciales, se detectaron 13 actividades enzimáticas en el extracto nativo, correspondientes a fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, esterasa, esterasa lipasa, leucina arilamidasa, tripsina, Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, α-galactosidasa, β-galactosidasa, α-glucosidasa, β-glucosidasa, N-acetil-β-glucosaminidasa y α-manosidasa; no se detectó actividad lipasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa, α-quimiotripsina, β-glucuronidasa o α-fucosidasa (**Tabla 14**).

Tabla 14. Determinación cualitativa de la actividad enzimática de los extractos nativos de *A. alternata*. (+: detectado, -: no detectado).

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	EXTRACTO NATIVO
Fosfatasa alcalina	+
Esterasa (C 4)	+
Esterasa lipasa (C 8)	+
Lipasa (C 14)	-
Leucina arilamilasa	+
Valina arilamidasa	-
Cistina arilamidasa	-
Tripsina	+
α -quimiotripsina	-
Fosfatasa ácida	+
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+
α -galactosidasa	+
β -galactosidasa	+
β -glucuronidasa	-
α -glucosidasa	+
β -glucosidasa	+
N-acetil- β -glucosaminidasa	+
α -manosidasa	+
α -fucosidasa	-

La **Tabla 15** muestra los resultados de cuantificación de las diferentes actividades específicas analizadas, expresadas en equivalentes de la enzima/mg de proteína. Según estos resultados, la actividad serín-proteasa es la más importante, seguida de la fosfatasa alcalina, la tripsina y la fosfatasa ácida; la enzimas con actividad cisteín-proteasa fueron las menos abundantes en el extracto nativo.

Todas las enzimas analizadas presentaron una pérdida de actividad en el extracto polimerizado respecto al nativo. La actividad tripsina presentó una pérdida prácticamente total de su actividad (99,73%), al igual que las serín-proteasas, que presentaron un porcentaje de disminución del 90,05%. La actividad fosfatasa ácida y alcalina también presentaron una disminución de su capacidad enzimática (71,33% y 75,5%, respectivamente). La actividad cisteín-proteasa se vio reducida en un 59,15%.

Tabla 15: Actividades proteolíticas específicas, expresadas en equivalentes de enzima/mg proteína, determinadas en los extractos nativo y polimerizado de *A. alternata*.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	EXTRACTO NATIVO	EXTRACTO POLIMERIZADO	% PÉRDIDA*
Tripsina	119,049	0,321	99,73
Serín-proteasa	6172,52	614,03	90,05
Cisteín-proteasa	3,55	1,45	59,15
Fosfatasa ácida	98,62	28,27	71,33
Fosfatasa alcalina	543,86	134,80	75,21

* Porcentaje de pérdida de actividad proteolítica del extracto polimerizado respecto al nativo

El efecto de la pérdida de actividad proteolítica en los extractos de *A. alternata* se confirmó en el estudio de las mezclas con gramíneas y ácaros. Se analizaron los perfiles proteicos y alergénicos de las mezclas de extractos de *A. alternata* y *P. pratense* y del extracto de *P. pratense* sin mezclar (control), a diferentes tiempos de incubación (**Figura 21**). La mezcla de los dos extractos nativos reveló, desde el inicio del estudio (tras la primera hora de incubación), la degradación de los alérgenos de la gramínea, observándose la desaparición de bandas de tamaño molecular superior a 37 kDa. El perfil alergénico también reveló una degradación de los alérgenos de *P. pratense* en la mezcla con el extracto nativo de *A. alternata*. La desaparición de bandas y la disminución de intensidad fue mayor a los 3 meses de incubación. El perfil proteico del extracto nativo de *P. pratense* en mezcla con el extracto polimerizado de *A. alternata*, no mostró diferencias respecto al extracto de la gramínea sin mezclar. El perfil alergénico del extracto de *P. pratense* sin mezclar y en mezcla con el extracto polimerizado del hongo, mostró una disminución general de la intensidad de las bandas transcurridos 3 meses de incubación.

La potencia biológica de las mezclas se evaluó mediante ELISA de competición. La potencia de la muestra de *P. pratense* sin mezclar se mantuvo durante todo el estudio (**Figura 22**). Estos valores se tomaron como referencia (100% de potencia) en cada tiempo de incubación para determinar la potencia de los extractos en mezcla. El extracto nativo de *P. pratense* en mezcla con el extracto nativo del hongo presentó al inicio del estudio una potencia biológica del 67,78% respecto al extracto de la gramínea sin mezclar. La potencia biológica

del extracto de *P. pratense* fue disminuyendo hasta suponer, a los 3 meses, un 3,36% de la potencia del extracto nativo de *P. pratense* sin mezclar tomado como referencia.

La potencia biológica del extracto nativo de *P. pratense* en mezcla con el extracto polimerizado de *A. alternata* se mantuvo en un rango similar a la potencia observada en el extracto nativo de *P. pratense* utilizado como referencia, a lo largo del estudio (**Figura 23**).

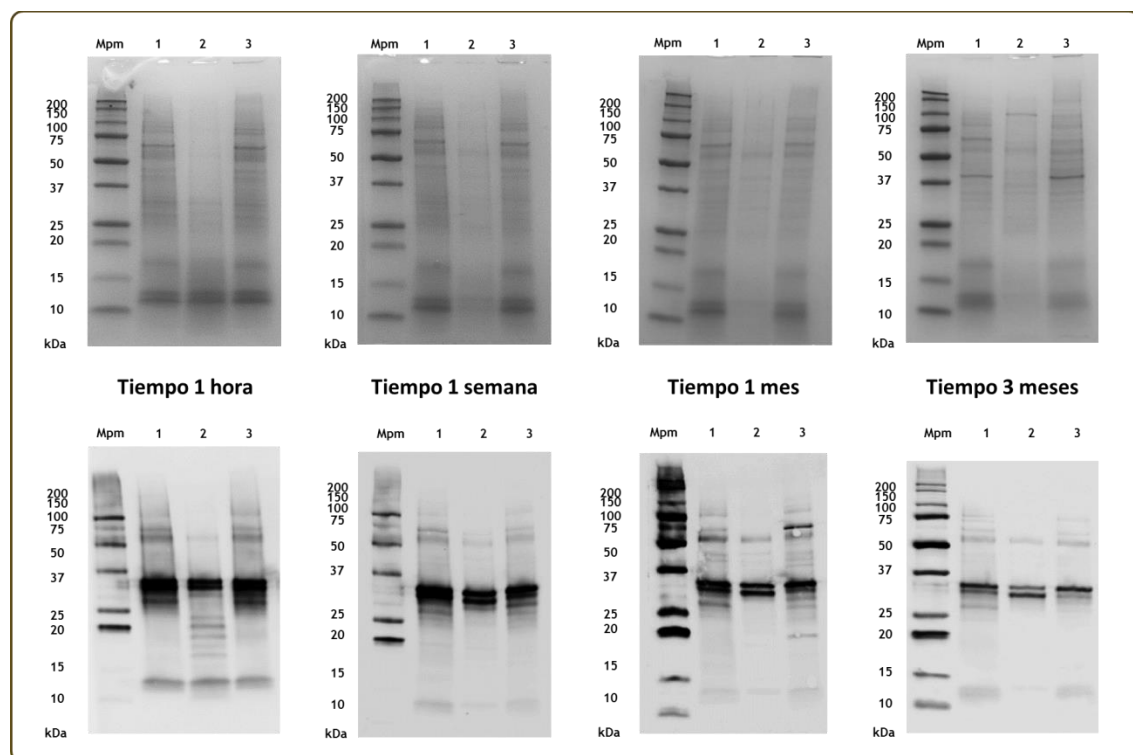


Figura 21: SDS-PAGE (superior) y *Western blot* IgE (inferior) de las muestras de *P. pratense*, tras diferentes tiempos de incubación. 1: extracto nativo de la gramínea; 2: mezcla de extractos nativos de *P. pratense* y *A. alternata*; 3: mezcla de extracto nativo de *P. pratense* y extracto polimerizado de *A. alternata*. Mpm: Marcador de peso molecular.

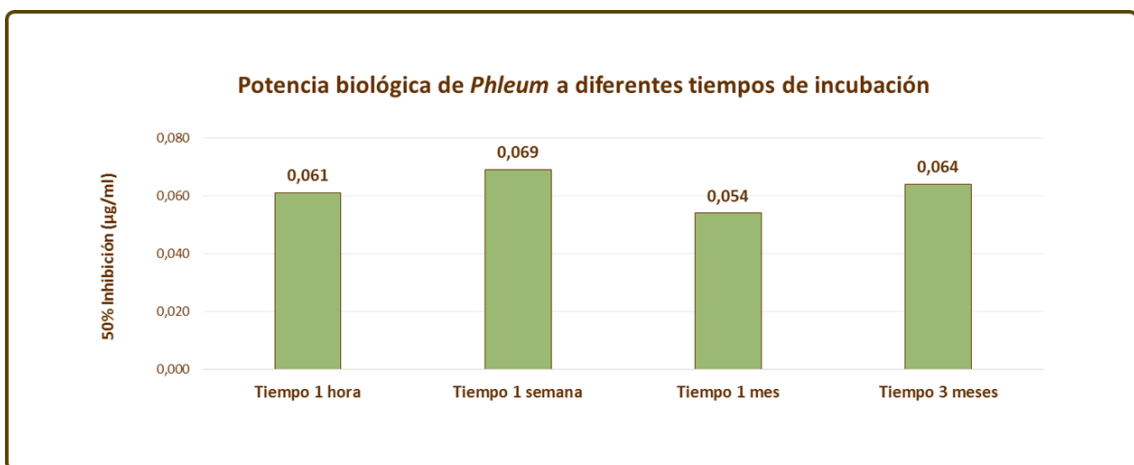


Figura 22: Potencia biológica de extractos nativos de *P. pratense* sin mezclar, tras incubación a diferentes tiempos.

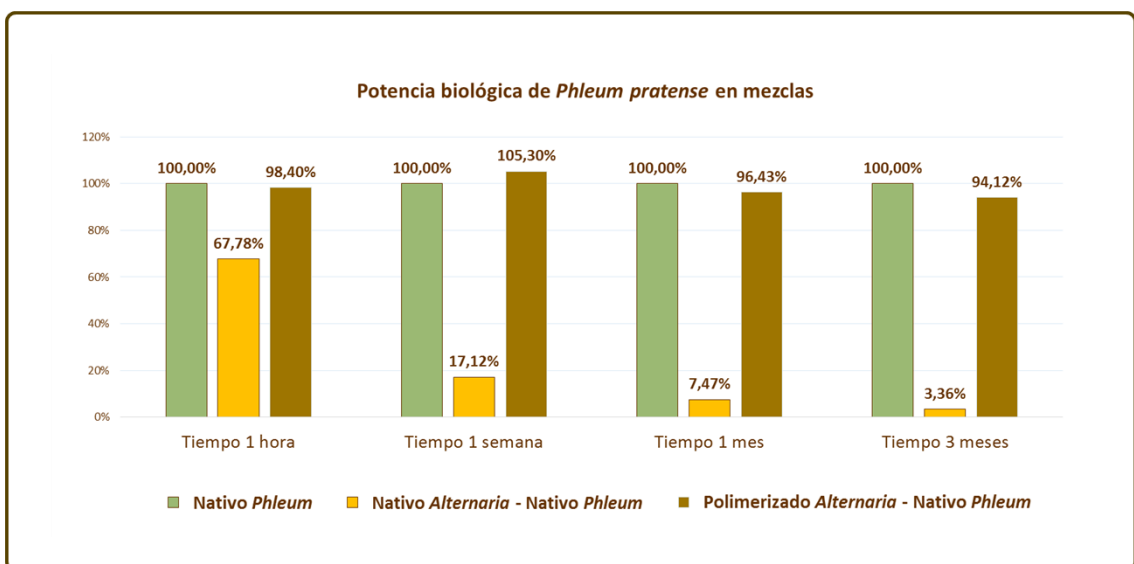


Figura 23: Porcentaje de potencia biológica del extracto nativo de *P. pratense* en mezcla con los extractos de nativo o polimerizado de *A. alternata*, respecto al extracto de la gramínea sin mezclar, a diferentes tiempos de incubación.

En el caso de *D. pteronyssinus*, los perfiles proteicos y alergénicos del extracto nativo del ácaro en mezcla con los extractos nativo o polimerizado de *A. alternata* no mostraron diferencias respecto al extracto nativo del ácaro sin mezclar utilizado como control durante todo el estudio (**Figura 24**).

La potencia biológica del extracto nativo del ácaro sin mezclar se mantuvo durante todo el estudio (**Figura 25**). Estos valores se tomaron como referencia (100% de potencia) en cada tiempo de incubación para evaluar la potencia del extracto de *D. pteronyssinus* en mezcla. La potencia biológica del ácaro, tanto en mezcla con el extracto nativo de *A. alternata* como con el extracto polimerizado, se mantuvo dentro de unos rangos similares a los de la muestra control (extracto nativo del ácaro sin mezclar) (**Figura 26**).

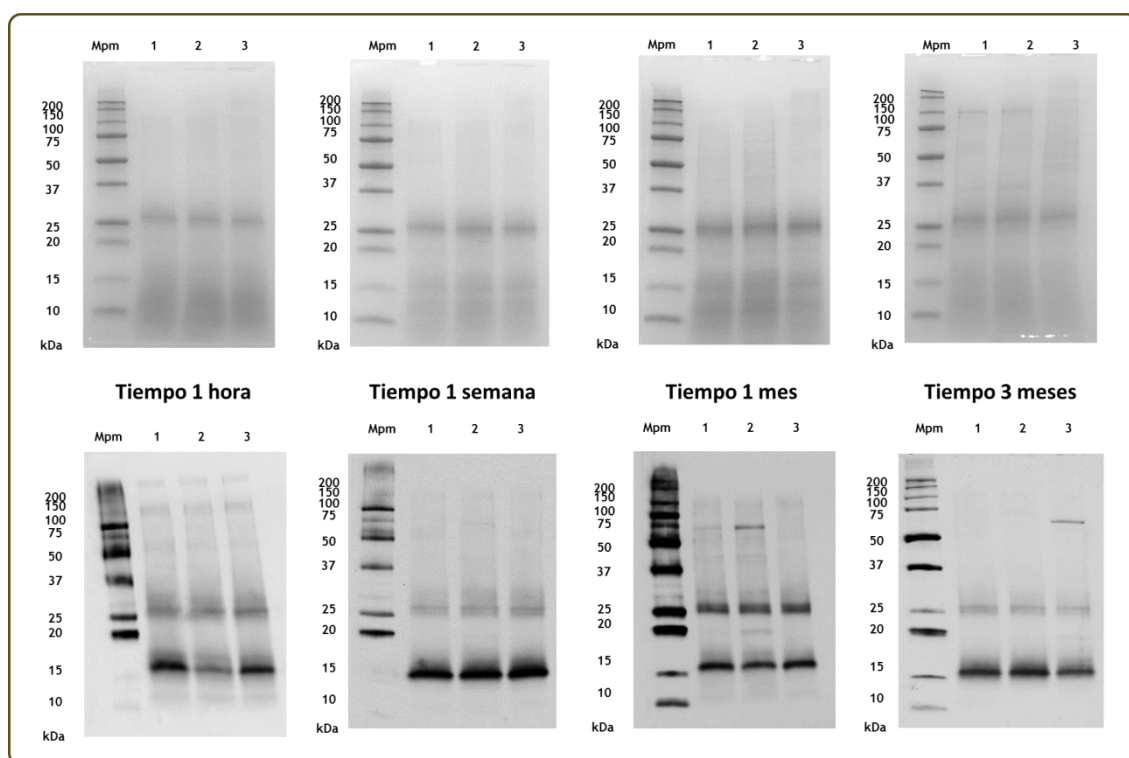


Figura 24: SDS-PAGE (superior) y Western blot IgE (inferior) de las muestras de *D. pteronyssinus* tras diferentes tiempos de incubación. 1: extracto nativo del ácaro; 2: mezcla de extractos nativos de *D. pteronyssinus* y *A. alternata*; 3: mezcla de extracto nativo de *D. pteronyssinus* y extracto polimerizado de *A. alternata*. Mpm: marcador de peso molecular.

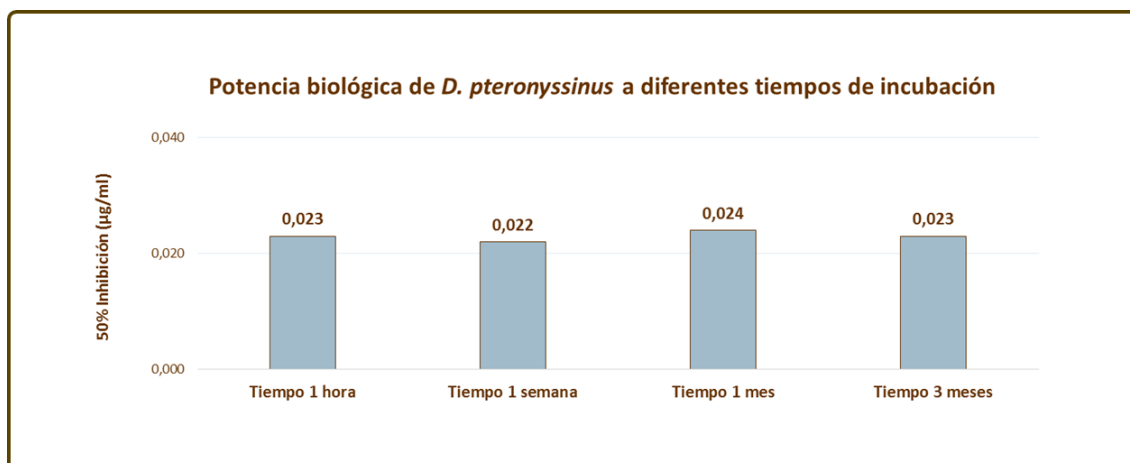


Figura 25: Potencia biológica de extractos nativos de *D. pteronyssinus* sin mezclar, tras incubación a diferentes tiempos.

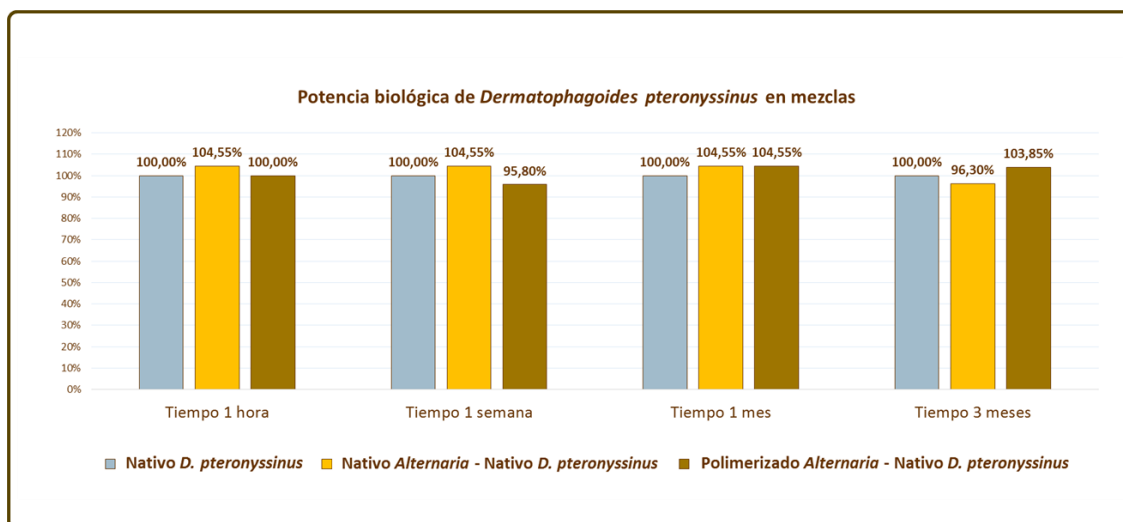


Figura 26: Porcentaje de potencia biológica del extracto nativo de *D. pteronyssinus* en mezcla con los extractos de nativo o polimerizado de *A. alternata*, respecto al extracto del ácaro sin mezclar, a diferentes tiempos de incubación.

4. Ensayos de inmunización en ratones

Los resultados de linfoproliferación de los esplenocitos obtenidos de ratones inmunizados con el extracto nativo y polimerizado se muestran en la **Figura 27**. Los niveles de endotoxina cuantificados en los extractos fueron superiores a 10 ng/µg proteína. Se observó que la estimulación tanto con el extracto nativo como con el polimerizado induce una proliferación de los esplenocitos de ambos

grupos de ratones significativamente superior a la basal (sin estímulo). Estos resultados indican que la administración de los dos tipos de extracto inducen la diferenciación de linfocitos y que los epítomos presentes en el extracto nativo están representados en el extracto polimerizado, y viceversa (comparten epítomos).

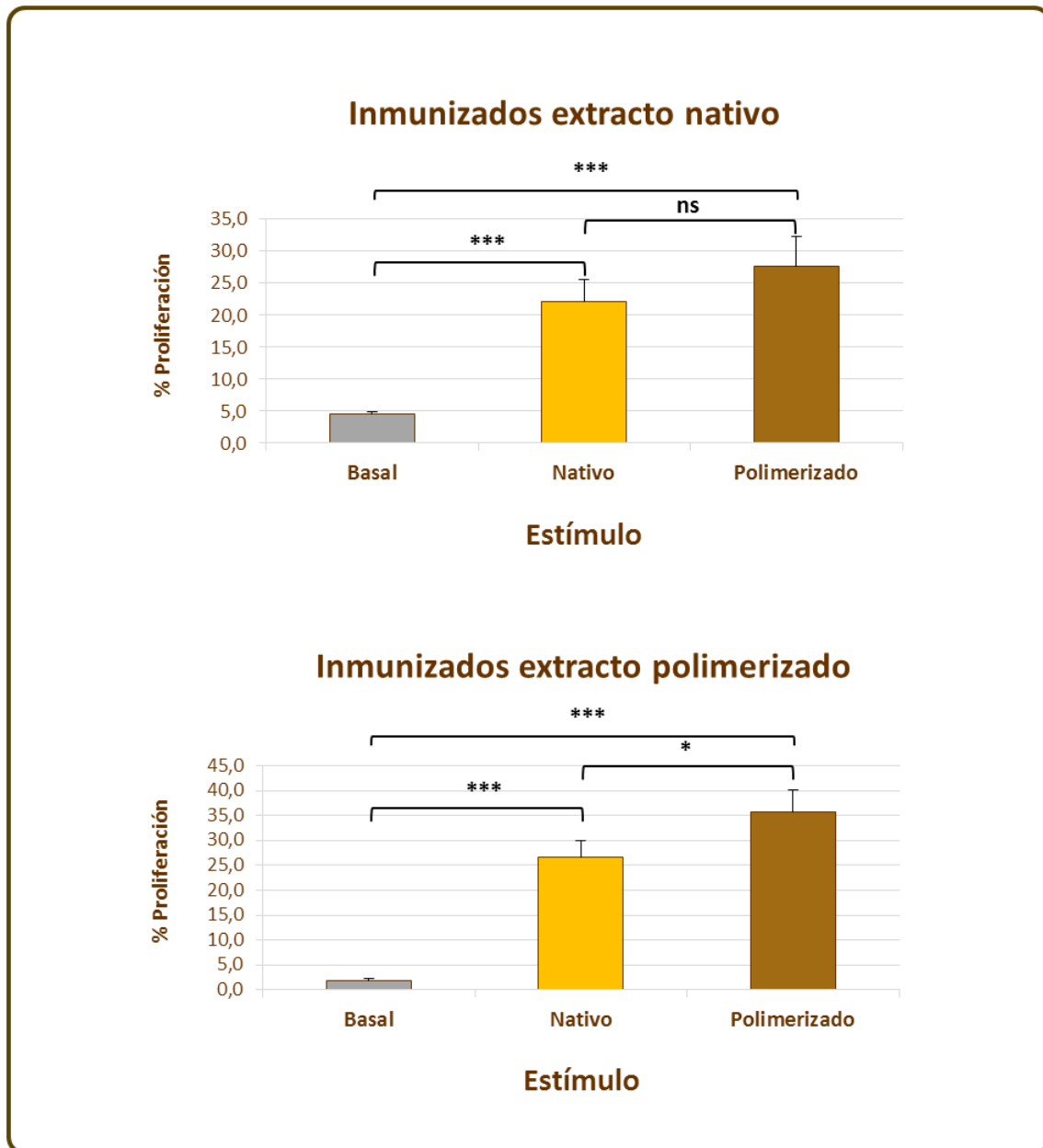


Figura 27: Resultados de linfoproliferación de esplenocitos de ratones inmunizados con el extracto nativo (arriba) y polimerizado (abajo), tras la estimulación a 5 días con los extractos nativo o polimerizado. ns: no significativo; *: nivel de significación <0,05; ***: nivel de significación <0,001.

El análisis del contenido de anticuerpos IgG total en suero de ratones inmunizados, específicos al extracto nativo de *A. alternata*, se muestran en la **Figura 28**. Los sueros de los ratones inmunizados con los extractos presentaron un contenido en IgG total significativamente mayor que los sueros del grupo control ($p < 0,001$). El análisis de los niveles de IgG1 también reveló unos niveles de IgG1 significativamente mayores ($p < 0,001$) en los dos grupos de ratones inmunizados con los extractos, respecto a los obtenidos en suero del grupo control (**Figura 29**). Los niveles de anticuerpos IgG2a analizados no mostraron diferencias significativas entre los tres grupos de ratones (**Figura 30**). En cuanto a los anticuerpos IgE, se observó que los dos grupos de ratones inmunizados con los extractos presentaron niveles significativamente superiores al grupo control ($p < 0,001$) (**Figura 31**).

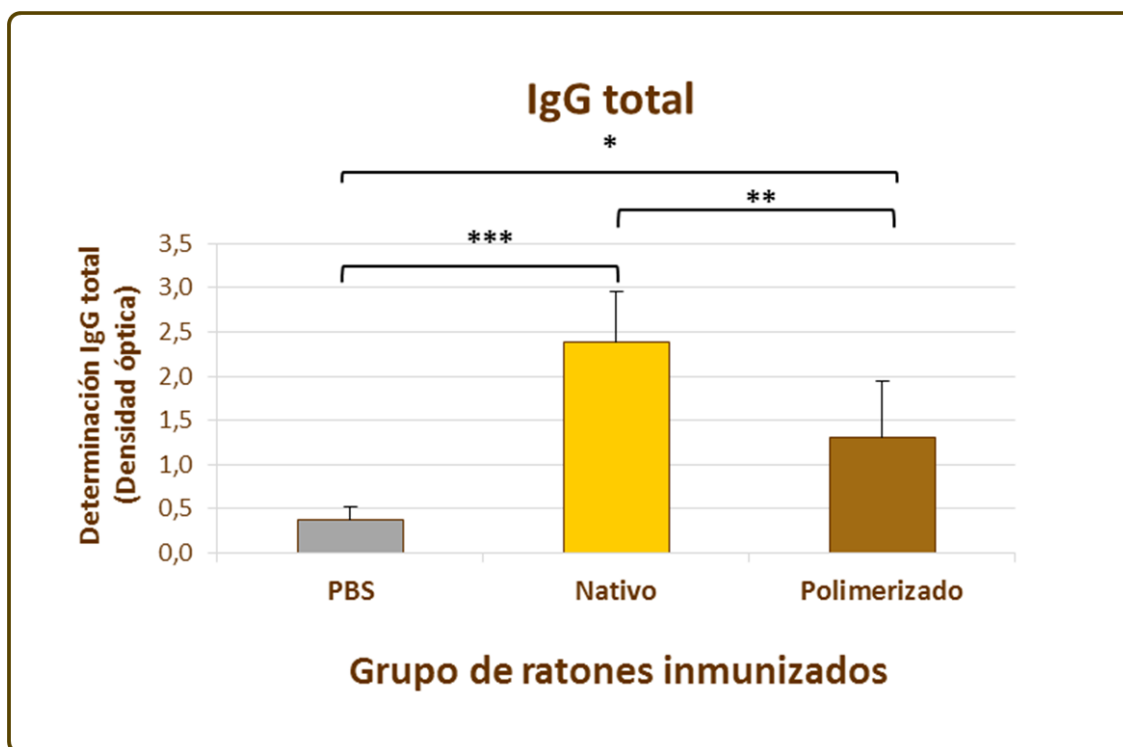


Figura 28: Niveles de IgG total específica a extracto nativo de *A. alternata*, determinados en sueros de ratones inmunizados. ns: no significativo; *: nivel de significación $<0,05$; **: nivel de significación $<0,01$; ***: nivel de significación $<0,001$.

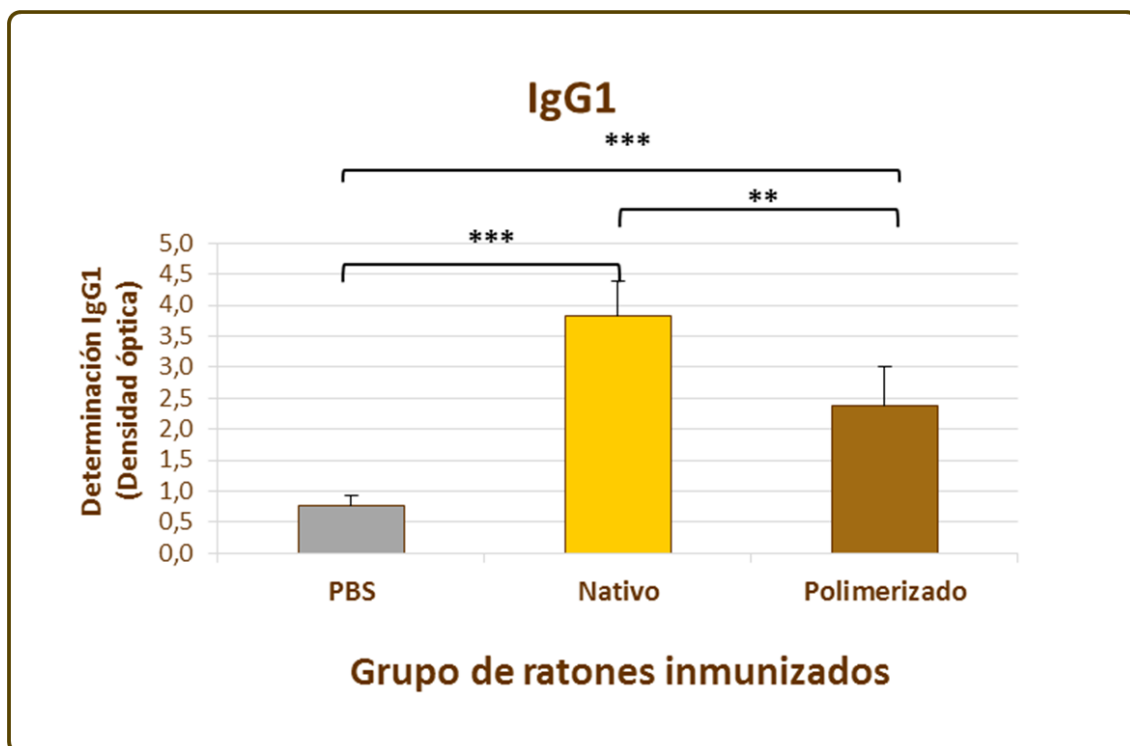


Figura 29: Niveles de anticuerpos IgG1 detectados en suero de ratones inmunizados con extractos nativos y polimerizados. ns: no significativo; *: nivel de significación <0,05; **: nivel de significación <0,01; ***: nivel de significación <0,001.

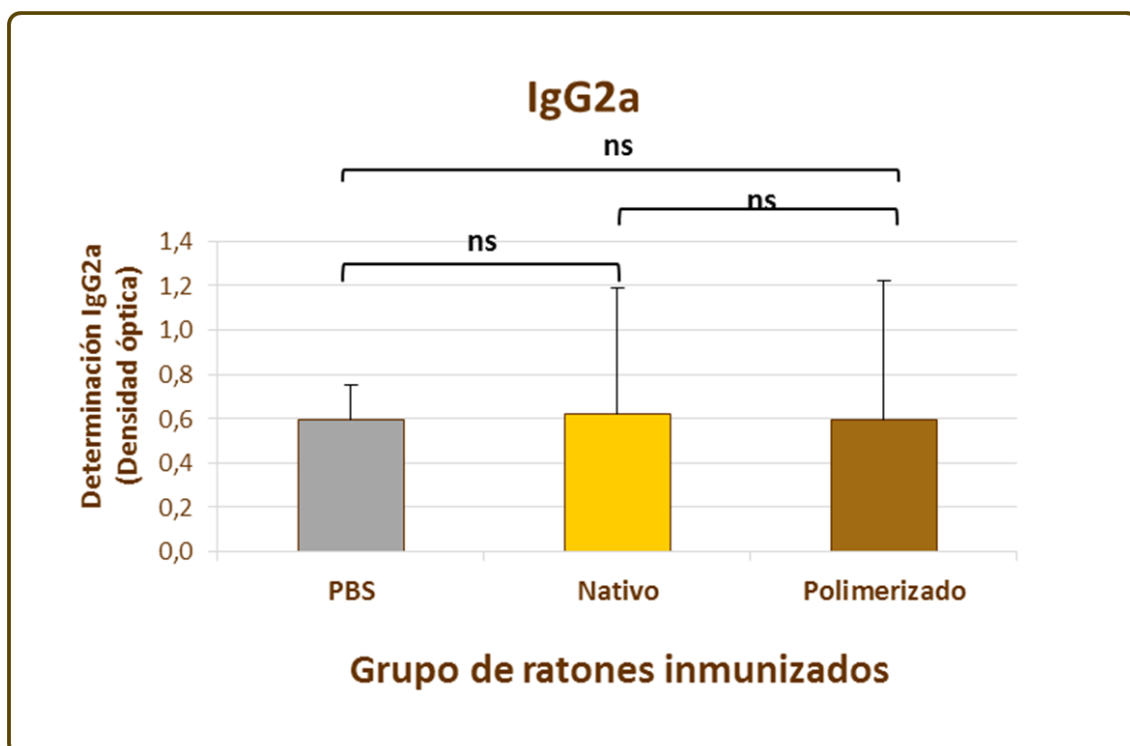


Figura 30: Determinación del título de anticuerpos IgG2a específicos a *A. alternata* en sueros de ratones inmunizados. ns: no significativo; *: nivel de significación <0,05; **: nivel de significación <0,01; ***: nivel de significación <0,001.

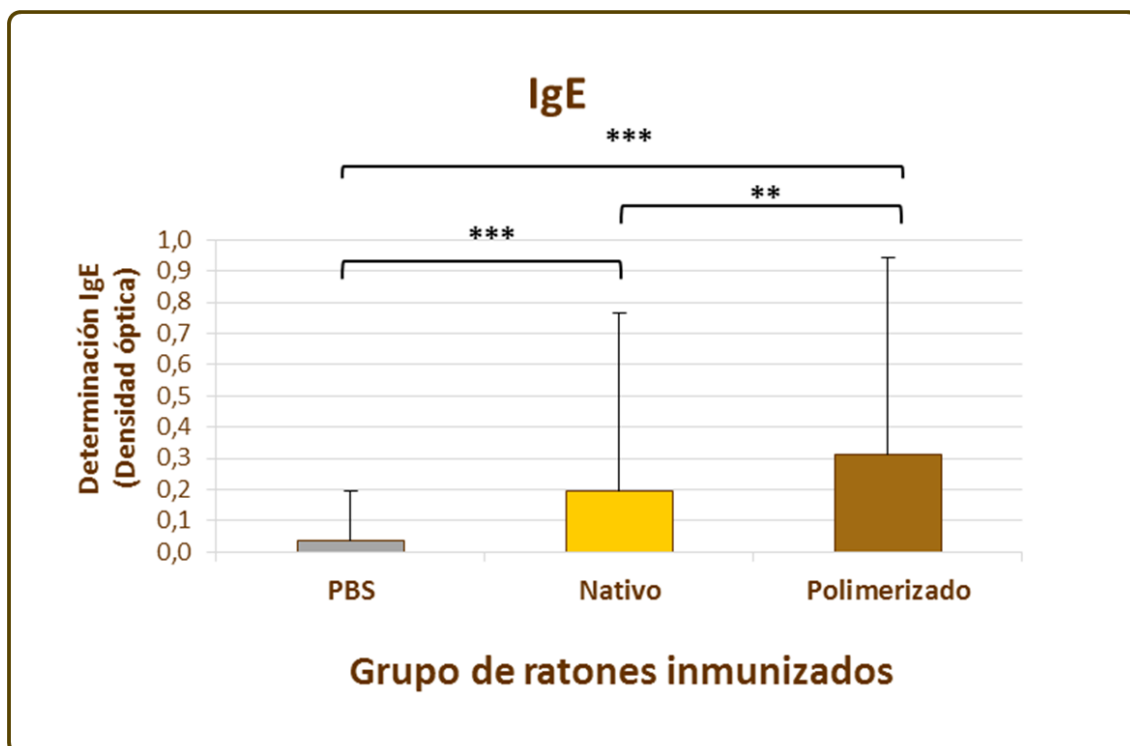


Figura 31: Niveles de anticuerpos IgE específicos a alérgenos de *A. alternata* determinados en sueros de ratones inmunizados con extractos nativos y polimerizados. ns: no significativo; *: nivel de significación <0,05; **: nivel de significación <0,01; ***: nivel de significación <0,001.

En la **Figura 32** se muestran los ensayos de *Western blot* IgG realizados con los sueros de los ratones inmunizados con los dos tipos de extracto, a una misma dilución de suero. La inmunodetección con los sueros de los ratones inmunizados con el extracto nativo, reveló la presencia de anticuerpos IgG con capacidad de unión a proteínas de diferentes tamaños moleculares en el extracto nativo, que podrían corresponder con los alérgenos Alt a 1 (15 kDa), Alt a 13 y/o Alt a 14 (26 y 24 kDa), Alt a 8 (29 kDa), Alt a 10 (53 kDa), y Alt a 4 y/o Alt a 15 (57 y 58 kDa); en el extracto polimerizado también fue posible detectar la unión de IgG a las proteínas polimerizadas (señal correspondiente a un tamaño molecular de >100 kDa). La inmunodetección realizada con los sueros de los ratones inmunizados con el extracto polimerizado reveló un perfil de detección similar; la intensidad de señal obtenida fue menor debido, posiblemente, al menor contenido en suero de anticuerpos IgG, respecto al de los ratones inmunizados con el extracto nativo.

El análisis del contenido de anticuerpos en suero sugiere que la administración de extractos nativos o polimerizados induce en los ratones la diferenciación y proliferación de linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos IgG específicos de *A. alternata*. Además, los resultados de *Western blot* indican que los epítomos B presentes en el extracto nativo se encuentran representados en el extracto polimerizado, y viceversa.

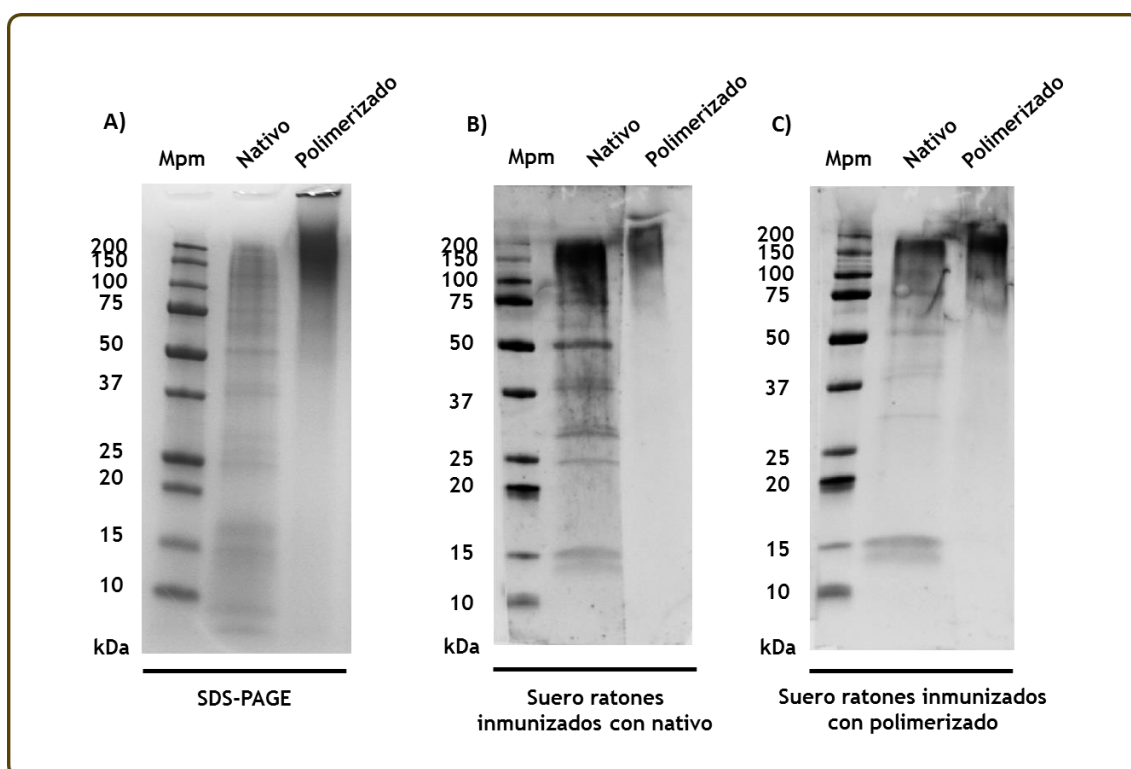


Figura 32: *Western blot* IgG de los extractos nativo y polimerizado, incubados con sueros de ratones inmunizados con el extracto nativo (B) o polimerizado (C). En la figura se muestra además, el perfil electroforético de los extractos empleados (A). Mpm: Marcador de peso molecular.

Se analizó el posible papel bloqueador IgE de los anticuerpos IgG producidos por los ratones inmunizados con los extractos nativo y polimerizado. Para ello, se realizaron *Western blot* de inhibición IgE, pre-incubando las membranas con los sueros de los ratones inmunizados y, posteriormente, con una mezcla de sueros de pacientes sensibilizados a *A. alternata*. Se observó una pérdida casi total de detección de proteínas, tanto del extracto nativo como del polimerizado, al preincubar con los sueros de los dos grupos de ratones

inmunizados (**Figura 33**). Se observó detección de bandas de unos 15 y 30 kDa en el extracto nativo, aunque la intensidad de señal fue menor que la obtenida en el ensayo sin inhibición. Estos resultados sugieren que la inmunización con el extracto nativo y polimerizado induce la producción de anticuerpos IgG frente proteínas alergénicas de *A. alternata*, cuyos epítomos coinciden (al menos en parte) con los epítomos reconocidos por los anticuerpos IgE de pacientes sensibilizados.

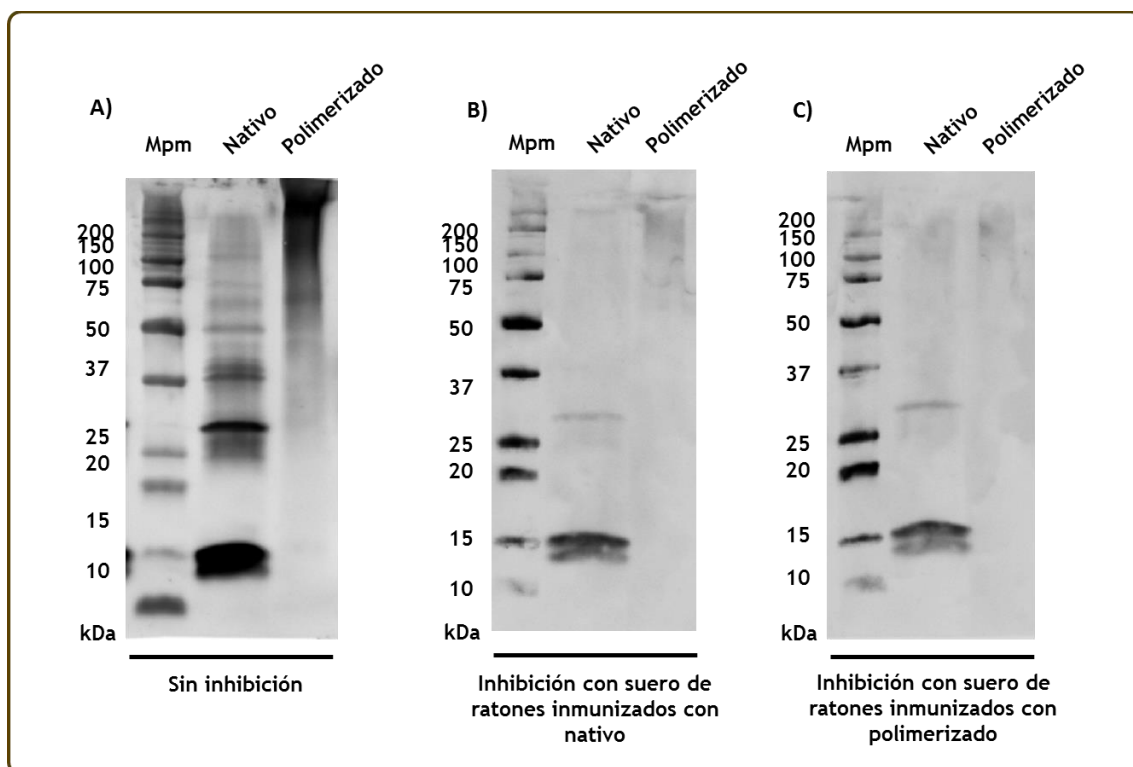


Figura 33: Western blot de inhibición IgE de los extractos nativo y polimerizado, utilizando una mezcla de sueros comercial de pacientes sensibilizados a *A. alternata*: A) Inmunodetección indirecta (sin inhibición); B) Inhibición con sueros de ratones inmunizados con el extracto nativo; C) Inhibición con sueros de ratones inmunizados con el extracto polimerizado. Mpm: Marcador de peso molecular.

F. Estudios de toxicidad en ratones y cobayas

Los estudios de toxicidad realizados en ratones y cobayas determinaron que el extracto polimerizado administrado a dosis terapéuticas no es tóxico (Anexo).

Discusión

VII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se describen los diferentes métodos empleados para el desarrollo y optimización del proceso de obtención de extractos alergénicos polimerizados de *A. alternata*. Este proceso consistió en 3 etapas: 1) optimización del método de cultivo para la obtención de un mayor rendimiento proteico; 2) concentración y purificación de los extractos alergénicos y 3) optimización de las condiciones de polimerización. Tras la obtención de los extractos polimerizados, estos fueron caracterizados, determinándose su contenido proteico, alergénico y de carbohidratos, así como su tamaño molecular. La evaluación de su alergenicidad demostró una disminución de la potencia biológica, respecto a los extractos nativos y una reducción de su actividad enzimática. La administración de estos extractos a ratones reveló su capacidad inmunogénica, observándose una inducción de la producción de anticuerpos IgG con capacidad bloqueadora de IgE humana. Los resultados obtenidos en este trabajo han sido utilizados para desarrollar extractos *A. alternata* polimerizados como una alternativa al empleo de extractos nativos en el tratamiento de la alergia respiratoria, producida por la inhalación de alérgenos de esta especie de hongo.

A. Obtención de extractos alergénicos fúngicos

La variedad de cepas y la variabilidad antigénica y alergénica que presentan los hongos dificultan enormemente los procesos de estandarización de los extractos fúngicos, por lo que aún no había sido posible establecer unas pautas generales para el cultivo y extracción de alérgenos fúngicos, que aseguren una homogeneidad entre fabricantes. Se puede observar en la literatura científica el empleo de condiciones de cultivo comunes (temperatura de incubación, periodo de crecimiento y cultivo estático en medio líquido Czapek), similares a las que se reproducen en este trabajo ^{135, 154, 155}. El crecimiento y esporulación de los hongos depende de diversos factores, como el medio de cultivo en el que se desarrollan, el pH, la temperatura, la luz y el grado de humedad, que influyen a su vez, en la composición en proteínas, glucoproteínas y polisacáridos. Estos

factores no afectan de igual manera a todos los hongos. Cada especie, y dentro de éstas, cada cepa, presenta sus propios requerimientos para un crecimiento óptimo ¹⁵⁶⁻¹⁵⁹. Diferentes autores han propuesto la combinación de varios extractos obtenidos a partir de diferentes cepas, con el fin de asegurar la homogeneidad entre lotes de extractos ¹⁶⁰⁻¹⁶³. Por ello, en este trabajo se emplea una mezcla de 2 cepas diferentes de *A. alternata*. La utilización de varias cepas en la producción de extractos alergénicos favorece que los diferentes alérgenos presentes en el ambiente de forma natural se encuentren representados en los productos utilizados para el diagnóstico y tratamiento de la alergia a hongos. Además de la composición del medio y la forma en la que los nutrientes están disponibles, la adición de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (fructosa, glucosa, sacarosa, nitrato potásico o sódico, etc.) también determinan el desarrollo de los hongos y la composición molecular de sus extractos ^{161, 163-166}.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran un incremento del rendimiento proteico en el cultivo de *A. alternata* en medio líquido suplementado con fructosa respecto al cultivo en medio semisólido sin fructosa. Se ha observado que la adición de fructosa al medio de cultivo de *A. alternata* puede inducir la producción de alérgenos como enolasas o serín-proteasas ^{167, 168}. Twaroch y col. ¹⁶⁹ demostraron mediante la utilización de anticuerpos específicos que la expresión de alérgenos como Alt a 3, Alt a 6 y Alt a 8, varía en función de la cepa, pero también del tipo de medio empleado y el tiempo de cultivo; Martínez y col., observaron que el cultivo de diferentes cepas de *A. alternata* bajo idénticas condiciones presenta diferencias en cuanto a la expresión Alt a 1 ¹⁵⁴. La comparación del contenido proteico de los extractos obtenidos a partir del cultivo con o sin fructosa, no reveló diferencias en la producción del alérgeno principal, Alt a 1, en relación al contenido en proteína total, aunque sí aumentó de forma proporcional al resto de proteínas en el cultivo líquido suplementado con fructosa. Además, se observó que la fase metabólica es la que realiza el mayor aporte de este alérgeno en ambos tipos de cultivo, de acuerdo con datos reportados previamente. Se ha demostrado que Alt a 1 es una molécula liberada al medio durante la germinación de las esporas, por lo que la mayor cantidad de Alt a 1 detectada en los cultivos se encuentra en esta fase ⁸⁵.

Lizaso y col. ¹³⁵ analizaron la potencia biológica de diferentes extractos de *A. alternata* obtenidos a partir del medio de cultivo y de los micelios, observando,

mediante la utilización de sueros de pacientes sensibilizados, que la fase metabólica presentaba la mayor alergenicidad. De este modo, determinaron que estos extractos podrían ser efectivos para el tratamiento de la alergia de estos pacientes, puesto que se encuentran sensibilizados frente a los alérgenos presentes en el medio de cultivo (principalmente, Alt a 1). Algunos de los extractos comerciales disponibles para el tratamiento de la alergia a *A. alternata* son preparados únicamente a partir de las fases metabólicas. Sin embargo, estos extractos podrían no ser eficaces en pacientes sensibilizados a alérgenos minoritarios, como los que se pueden encontrar en los micelios y esporas. Por lo tanto, no se debería obviar la aportación alergénica de la fase somática, dado que el éxito del diagnóstico y tratamiento de las alergias dependerá, en gran medida, de la composición alergénica de los extractos. Actualmente, el único anticuerpo comercial disponible para la cuantificación de alérgenos de *A. alternata* es el específico para Alt a 1. Los extractos obtenidos durante la fase de optimización del método cultivo mostraron, mediante inmunodetección con sueros de pacientes sensibilizados, una variedad de proteínas con capacidad de unión IgE, además de Alt a 1. La disponibilidad de otros anticuerpos específicos a alérgenos minoritarios, como los desarrollados por Twaroch y col.¹⁶⁹ frente Alt a 3, Alt a 6 y Alt a 8, podría facilitar la caracterización de los extractos alergénicos y, por tanto, su estandarización biológica, permitiendo un mejor diagnóstico y tratamiento de la alergia a *A. alternata*.

B. Concentración y purificación de alérgenos

Los extractos alergénicos utilizados para el diagnóstico y tratamiento de las alergias deben reflejar la complejidad natural de la fuente alergénica. No obstante, se reconoce la necesidad de eliminar los componentes de bajo peso molecular (inferior a 5 kDa), puesto que son irrelevantes desde el punto de vista alergénico y pueden presentar un efecto irritante inespecífico¹⁷⁰. Para la eliminación de estas moléculas, el método al que se recurre con mayor frecuencia es la ultrafiltración tangencial que permite, no sólo fraccionar los extractos mediante la filtración a través de una membrana de tamaño de poro determinado, sino también dializar y reducir el volumen de solvente.

Los alérgenos suelen ser proteínas de tamaño molecular comprendido entre 5 y 100 kDa. La combinación de dos procesos de UFT a través de membranas de tamaño de poro de 5 y 100 kDa, permite la concentración de los alérgenos y la eliminación de moléculas no alergénicas, obteniéndose extractos alergénicos purificados (de entre 5 y 100 kDa). El fraccionamiento de alérgenos ha sido realizado con éxito en extractos de pólenes y ácaros (datos no publicados). Sin embargo, los resultados obtenidos con los extractos de *A. alternata* fraccionados por 100 kDa, parecen indicar que no todos los alérgenos son capaces de atravesar la membrana, al observarse que la fracción de >100 kDa, presenta capacidad de unión IgE. Además, los resultados de electroforesis sugieren que algunas proteínas de tamaños moleculares inferiores a 100 kDa se encuentran retenidas de alguna forma en la fracción de >100 kDa, o formando parte de estructuras de mayor tamaño molecular que se desprenden al ser sometidas a las condiciones desnaturizantes de la electroforesis (calor y presencia de agentes reductores, como β -mercaptoetanol).

Se ha descrito que determinadas fuentes alergénicas presentan alérgenos de alto peso molecular, como algunos alérgenos de la soja (Gly m 5, Gly m 6), de ácaros (Der p 14, Der f 14, Der f 15) o, incluso, *Aspergillus* (Asp f 12, Asp n 14, Asp n 25); también se ha reportado la capacidad de algunos alérgenos de formar agregados de tamaño molecular superior a 100 kDa, debido a su naturaleza glicoproteica ^{171, 172}. La presencia de alérgenos de elevado peso molecular aún no descritos, o la existencia de agregados en los extractos podrían explicar los resultados obtenidos tras el fraccionamiento por UFT.

El análisis proteómico de la fracción de >100 kDa mediante espectrometría de masas confirmó la presencia de casi todos los alérgenos de *A. alternata* aceptados por la WHO/IUIS (salvo Alt a 13). En la fracción <100 kDa únicamente fue posible detectar los alérgenos Alt a 1, Alt a 10, Alt a 14 y Alt a 15. Estos resultados confirman que el fraccionamiento por UFT no ha sido efectivo y sugiere que los alérgenos pueden quedar retenidos en la fracción de >100 kDa. La posible presencia de agregados y su resolución se discuten más adelante.

Otro método de purificación ampliamente utilizado es la precipitación. Los procesos de precipitación consisten normalmente en la adición de sales o solventes orgánicos que alteran la naturaleza de la solución, de tal manera que las proteínas se desnaturizan y precipitan. Los solventes orgánicos como el

etanol o la acetona provocan una disminución del grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la proteína, provocando su agregación y precipitación. Además, como consecuencia de esta pérdida de estructura, las proteínas pueden perder su capacidad proteolítica. La acetona es un solvente orgánico empleado, generalmente en combinación con tricloroacético (TCA), para producir la precipitación de proteínas en solución. Una de las desventajas del uso del TCA es la dificultad que presentan las proteínas para su resolubilización ¹⁷³, por lo que en este trabajo se consideró más ventajosa la utilización de acetona como solvente. Los resultados de electroforesis y ELISA obtenidos en los extractos antes y después de la precipitación con acetona, mostraron que los cambios que sufren las proteínas durante el proceso de precipitación, son reversibles. Además, posteriormente se pudo comprobar que los extractos nativos presentan actividad proteolítica tras este proceso. Por ello, se consideró la precipitación con acetona como un proceso óptimo para la purificación y concentración de alérgenos de *A. alternata*.

C. Polimerización de alérgenos de *A. alternata*

La modificación química de los alérgenos con glutaraldehído ha demostrado su eficacia en extractos alergénicos de pólenes o ácaros. Sin embargo, algunos alérgenos presentan dificultades para polimerizar, como es el caso de los alérgenos de hongos, del polen de las cupresáceas o los alérgenos de algunos alimentos. Koppelman y col. demostraron que la modificación de la congulina del cacahuete con GA no producía cambios en la estructura secundaria ni una disminución significativa de la unión de IgE ¹⁶⁻¹⁸. Los motivos por los que la polimerización con glutaraldehído no es efectiva en estos alérgenos pueden ser muy diversos. El glutaraldehído es un compuesto bifuncional utilizado principalmente en la modificación química de proteínas. Se une covalentemente a los grupos amino de las proteínas de forma que cuando estos dos grupos aldehído reaccionan con los grupos amino de diferentes proteínas se produce el entrecruzamiento de éstas. Se ha sugerido que el número de lisinas libres presente en los extractos es un factor clave en la polimerización con glutaraldehído ¹⁷⁴. Además de la disponibilidad de lisinas, su accesibilidad

también parece determinar la polimerización con GA. Silva y col. compararon la capacidad de polimerización de una solución de albúmina de suero bovino (BSA) y de caseína, observando una diferente reactividad con el GA entre ambas que asociaron a la conformación específica de cada proteína. La caseína es una proteína pequeña con una estructura abierta flexible, por lo que el acceso del GA a sus residuos de lisina es más sencillo que en el caso de la BSA, una proteína globular que tiene restricciones en el acceso a los residuos de lisina para reaccionar ¹⁷⁴. Los resultados de cromatografía de gases obtenidos en este trabajo han demostrado la presencia de residuos de lisina en una proporción similar a la del resto de aminoácidos, cuya detección disminuye tras el tratamiento con GA. Además, en el entrecruzamiento de las proteínas con GA intervienen también residuos de asparagina/aspartato y glutamina/glutamato, los cuáles representaron casi el 50% del total de aminoácidos presentes en el extracto nativo. Por lo tanto, se podría pensar que la dificultad de polimerización de estos alérgenos no se debe a un bajo contenido en estos residuos.

La dificultad de polimerización de los alérgenos fúngicos podría estar relacionada, no sólo con la accesibilidad del GA a los residuos, sino también con la distancia existente entre éstos para un entrecruzamiento efectivo. La relación carbohidrato/proteína de los extractos fúngicos suele ser elevada ⁷⁷; la presencia de estos carbohidratos en el extracto podría producir un impedimento estérico para el entrecruzamiento de las proteínas con el GA. Durante el proceso de optimización de la polimerización, la mayor pérdida de potencia biológica y de bandas de tamaño molecular inferior a 100 kDa se observó en los extractos tratados con la mayor concentración de GA. Esta concentración supone una relación GA/proteína superior a la empleada de forma rutinaria en otros alérgenos, como los de pólenes o ácaros. La utilización de mayores cantidades de GA parecería solventar el posible impedimento estérico provocado por los carbohidratos, incrementándose la probabilidad de reacción del GA con las proteínas y, por tanto, el entrecruzamiento de éstas.

Por otro lado, la presencia de bandas de tamaño molecular inferior a 100 kDa, observadas en las fracciones de >100 kDa podría indicar que, como se ha discutido previamente, estas proteínas se encuentran formando agregados que se desprenden al ser sometidos a las condiciones de la electroforesis. La agregación de proteínas es un fenómeno muy común, de gran importancia en la

fabricación de medicamentos ¹⁷⁵ dado que pueden producir reacciones inmunológicas adversas, e incluso, afectar a la actividad biológica de las vacunas, perjudicando significativamente su potencia y comprometiendo, por tanto, la eficacia del medicamento ^{176, 177}. La formación de agregados puede ocurrir durante la producción, almacenamiento, o durante el procesamiento de las proteínas, ya que está determinada por numerosos factores como la temperatura, la concentración de proteínas, el pH, la fuerza iónica, e incluso, el estrés mecánico (agitación, ultrafiltración, bombeo, etc.) ^{175, 178}; además, la heterogeneidad proteica también puede ser un factor que contribuya a la agregación, al aumentar la probabilidad de que las múltiples formas proteicas interaccionen. De esta forma, la presencia de agregados en los extractos proteicos también podría suponer un impedimento para el acceso del GA a los aminoácidos implicados en la polimerización.

En el proceso de optimización de la polimerización se emplearon 8 muestras de extracto nativo y se dividieron en dos grupos para su diálisis frente agua o PBS. Una muestra de extracto nativo de cada grupo se empleó como control y no fue tratada con GA, aunque sí se sometió a las mismas condiciones de diálisis que el resto de muestras (a través de un tamaño de poro de 100 kDa). Las dos muestras de extracto nativo obtenidas (retenido de >100 kDa) mostraron diferentes potencias biológicas entre sí (**Figura 13**). La muestra de nativo de >100 kDa dializada frente PBS mostró una mayor pérdida de potencia que la muestra dializada frente agua (un 72,5% de pérdida frente un 16,5%). Estos datos sugieren que la diálisis frente PBS influye en los extractos alergénicos, permitiendo una mejor eliminación de las moléculas no polimerizadas. Las interacciones no covalentes relativamente débiles, como las interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas, pueden producir una agregación proteica reversible, donde se suele observar un equilibrio entre el monómero y sus variantes de alto peso molecular. Este equilibrio puede variar como resultado de un cambio en las condiciones de la solución, como una disminución de la concentración proteica o un cambio de pH ¹⁷⁵. Previamente se ha analizado la influencia de diferentes sales en la formación de agregados y en la solubilidad de proteínas ¹⁷⁹. La utilización de una solución salina tamponada como el PBS, como solución dializante podría estar promoviendo la disolución de posibles agregados

presentes en los extractos, permitiendo una mayor accesibilidad del GA a los residuos amino de las proteínas.

En resumen, la baja concentración relativa de proteína y el posible impedimento estérico producido por un elevado contenido en carbohidratos, además de la posible existencia de agregados en los extractos, podrían explicar la dificultad que presentan los extractos fúngicos para polimerizar. Según los resultados obtenidos tras la optimización de la polimerización, estas dificultades parecen solventarse al realizar una diálisis previa de los extractos nativos mediante UFT frente PBS y al aumentar la relación GA/proteína en la reacción.

D. Caracterización molecular de los extractos polimerizados

El tratamiento de extractos alergénicos con GA produce el entrecruzamiento de los alérgenos y la formación de polímeros, de tamaño molecular superior al que presentan las moléculas en su estado natural. El análisis del perfil proteico y alergénico del extracto polimerizado mostró la presencia de un conjunto de moléculas de tamaño molecular superior a 100 kDa, no detectado en el extracto nativo. Además, las proteínas de menor peso molecular observadas en el extracto nativo no fueron detectadas en los perfiles del extracto polimerizado. Por otro lado, en el análisis por RMN del extracto polimerizado se detectó una población homogénea de moléculas, de tamaño molecular superior al de las 3 poblaciones heterogéneas identificadas en el extracto nativo. Estos resultados indican que los extractos obtenidos tras el tratamiento con GA están polimerizados, formando complejos de tamaño molecular superior a 100 kDa. En cuanto a la composición molecular de estas poblaciones, el análisis por RMN reveló la presencia de una importante fracción proteica en ambos extractos, así como de carbohidratos, cuya composición en monosacáridos, determinada por cromatografía y espectrometría, resultó ser similar en ambos.

El análisis de la composición proteica de los extractos nativo y polimerizado reveló la presencia de 4 alérgenos descritos en *A. alternata*, entre los que se encuentra el alérgeno principal Alt a 1 (Alt a 1, Alt a 10, Alt a 14, Alt a 15), confirmándose que estos alérgenos se encuentran contenidos en el polímero. En este análisis no fue posible identificar todos los alérgenos aceptados por la

WHO/IUIS. En los análisis previos realizados sobre extractos nativos se obtuvo la identificación de casi todos los alérgenos (salvo Alt a 13), lo que demuestra su presencia en las cepas empleadas para preparar estos extractos. La espectrometría de masas presenta limitaciones en el análisis de mezclas complejas de proteínas (sensibilidad limitada y elevada redundancia). Uno de los factores que influyen en la identificación de proteínas por LC-MS/MS es el rango dinámico de concentración, de forma que un menor contenido en estos alérgenos respecto al total de proteínas presentes dificulta su identificación. La gran variabilidad proteica que muestran las diferentes cepas fúngicas, así como la influencia de diversos factores en su desarrollo, podría explicar la menor expresión de algunas proteínas.

En el extracto completo se identificaron además 33 proteínas potencialmente alergénicas por su posible homología de función con otras proteínas previamente sugeridas como alérgenos en otras fuentes, incluyendo otros hongos. Entre éstas, se encuentran la proteína de choque térmico 70 y la glutatión-S-transferasa *theta* putativa, cuya función se corresponde con la de los alérgenos Alt a 3 y Alt a 13. La comparación de sus secuencias con las registradas en las bases de datos no presentó un porcentaje de homología suficientemente alto como para considerar que se trata exactamente de estos alérgenos (>90%), sino que, probablemente correspondan con proteínas alergénicas de la misma familia. No obstante, no hemos podido excluir la posibilidad de que si se trate de fracciones estos alérgenos, que no están bien estudiados.

Las recomendaciones de la WHO y la FAO (*Food and Agriculture Organization*) para determinar la alergenicidad potencial de las proteínas se basa en dos criterios: una identidad de al menos 6 aminoácidos contiguos o un porcentaje de similitud mínimo del 35% sobre 80 aminoácidos, al comparar la secuencia de la proteína con la de alérgenos conocidos ¹⁸⁰. La comparación de las secuencias de las proteínas identificadas en los extractos con las de los alérgenos aceptados por la WHO/IUIS mostró, en la mayoría de los casos, un porcentaje de similitud superior al 50%. En muchos casos, este porcentaje de similitud fue superior al 70%, como en el caso de la proteína fosfolipasa A2 de himenópteros, la proteína aldehído deshidrogenasa y la enzima tripsina de ácaros o la proteína de choque térmico de mosquito, de ácaros o de *Penicillium*

spp. Dada la elevada similitud de secuencia, se podría considerar la posibilidad de que estas proteínas identificadas en los extractos de *A. alternata* fueran potencialmente alergénicas. Cabe destacar también el elevado porcentaje de similitud, superior al 90%, que presentaron las tiorredoxinas, transaldolasas y aldehído deshidrogenasas identificadas, con las descritas en otros géneros de hongos como *Aspergillus*, *Fusarium* o *Cladosporium*; este resultado sugiere la posibilidad de que, no sólo se trate de proteínas potencialmente alergénicas, sino que además estén implicadas en fenómenos de reactividad cruzada entre estos hongos.

El desarrollo de nuevas tecnologías y su aplicación en proteómica, ha permitido realizar importantes avances en diferentes campos de la investigación en Medicina o Biología. La inmunoproteómica (una subdisciplina de la inmunómica) tiene como objetivo la identificación de péptidos o proteínas que induzcan respuestas inmunológicas. Se han elaborado mapas de antígenos inmunogénicos de *Staphylococcus aureus* mediante la combinación de electroforesis en 2 dimensiones, *Western blot* y espectrometría de masas. Otra estrategia utilizada en inmunoproteómica es la inmunocaptura MS, en la que se inmovilizan anticuerpos de pacientes para la detección de los antígenos específicos de una mezcla compleja de proteínas, permitiendo la detección de epítomos conformacionales¹⁸¹. La aplicación de estas estrategias con extractos alergénicos de *A. alternata* y sueros de pacientes sensibilizados podría contribuir a la identificación de nuevos alérgenos y la elaboración de un “inmunoproteoma” de *A. alternata*.

E. Caracterización inmunológica de los extractos polimerizados

Uno de los objetivos que persigue la polimerización de alérgenos con glutaraldehído es producir el entrecruzamiento de éstos de manera que los epítomos alergénicos queden inaccesibles a los anticuerpos IgE y por tanto, disminuya la probabilidad de reacciones adversas durante la vacunación. La potencia biológica de los extractos de *A. alternata* polimerizados, evaluada mediante ELISA de inhibición, presentó una media de disminución de la capacidad de unión IgE del 89%, respecto a los extractos nativos, mientras que

su capacidad de unión IgG se mantuvo en un rango similar al del nativo. Los resultados de las pruebas cutáneas realizadas con el extracto polimerizado, mostraron igualmente una disminución del tamaño del área de la pápula en un 73%, respecto a la producida por el extracto nativo de concentración equivalente (10 µg/ml Alt a 1). Estos datos indican que las proteínas de los extractos fúngicos han polimerizado y sugieren que parte de los epítomos IgE han quedado ocultos o inaccesibles, presentando una alergenicidad disminuida respecto a su nativo. Además, las enzimas presentes en los hongos desempeñan un papel importante en alergia, tanto de forma indirecta, al facilitar el paso de otros alérgenos a través de la barrera epitelial, como de forma directa, al actuar sobre células dendríticas y promover respuestas de tipo Th2. El entrecruzamiento de las enzimas con GA conlleva una serie de cambios estructurales en estas que se traducen en una disminución de su capacidad proteolítica y posiblemente también de su alergenicidad. El análisis enzimático realizado en los extractos demostró una disminución significativa ($p < 0,001$) de la actividad proteolítica en el extracto polimerizado respecto al extracto nativo. La disminución más importante se observó en las serín-proteasas (donde se incluyen las tripsinas), con más de un 90% de pérdida de capacidad proteolítica. Las fosfatasas también presentaron una elevada pérdida de actividad (superior al 70%). La menor pérdida de actividad se observó en las cisteín-proteasas (59,15%), menos abundantes en el extracto.

Además de contribuir a la pérdida de alergenicidad de los extractos, la disminución de la actividad enzimática derivada de la polimerización con GA puede ser utilizada para la combinación de diferentes extractos alérgicos, para una administración conjunta a pacientes polisensibilizados. Numerosos estudios han demostrado que las enzimas fúngicas pueden degradar los alérgenos de otras fuentes cuando se encuentran en mezclas acuosas e, incluso, en presencia de glicerina ^{148, 182-184}. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran cómo los alérgenos de *P. pratense* son degradados al encontrarse en mezcla acuosa con el extracto nativo de *A. alternata*, en concordancia con datos publicados previamente. El efecto de la acción de las enzimas fúngicas fue casi instantáneo, observándose una disminución de la potencia biológica de la gramínea de un 33,2%, transcurrida la primera hora de incubación. Por el contrario, el extracto polimerizado no pareció afectar a los alérgenos de la gramínea, dada la gran

reducción de su actividad proteolítica. La disminución de intensidad de bandas observada mediante electroforesis, tanto en esta mezcla como en el extracto sin mezclar podría ser debida a la propia degradación de la gramínea, pero no implica necesariamente una pérdida de potencia real, como se observó mediante ELISA de competición. Kordash y col. obtuvieron resultados similares al observar una disminución de potencia de *Lolium perenne* en mezcla glicerizada con el hongo *Helminthosporium* spp., evaluada mediante RAST. Sin embargo, la actividad biológica estimada mediante pruebas cutáneas no se vio alterada ¹⁸⁵.

En el caso de las mezclas con el extracto del *D. pteronyssinus*, no se observó degradación ni disminución de la potencia de los alérgenos del ácaro en mezcla con el extracto nativo, o polimerizado del hongo. Sin embargo si hay otros estudios que no recomiendan esta mezcla. Como se ha discutido previamente, el contenido proteico de los extractos fúngicos depende de diversos factores (cepa, medio y condiciones de cultivo, etc.), y el contenido en proteasas también se ve afectado por estas variables ¹⁶⁶. Esto podría explicar las diferencias observadas con los resultados obtenidos en trabajos previos, en los que se recomienda evitar la mezcla de extractos fúngicos y de ácaros ^{183, 186}. Tampoco se observó degradación de los alérgenos del ácaro ni disminución de su potencia biológica en mezcla con el extracto polimerizado de *A. alternata* debido a la pérdida de actividad proteolítica.

No todos los extractos son susceptibles de la acción de las enzimas de determinados extractos alérgénicos. Nelson y col. analizaron la potencia de mezclas de extractos fúngicos (géneros de *Alternaria*, *Aspergillus* y *Penicillium*) y cucaracha, concluyendo que no había evidencias de una reducción de la potencia de ninguno de los extractos ¹⁸². Kordash y col. analizaron el efecto en mezclas glicerizadas de extractos de hongos (*Helminthosporium interseminatum*), cucaracha y *Dermatophagoides farinae*, sobre extractos de *Lolium perenne*, observando una disminución de la potencia de *L. perenne* en todos los casos, salvo en la mezcla con el ácaro ¹⁸⁵. En otros estudios, los extractos de epitelio de gato, *D. pteronyssinus* y *Ambrosia* en mezcla glicerizada con un extracto de hormiga se mantuvieron estables tras 6 meses de incubación, mientras que los extractos de *P. pratense* en mezcla con el extracto de hormiga se degradaron durante el primer mes ^{148, 149}. Por lo tanto, la susceptibilidad de

los alérgenos a ser degradados por proteasas fúngicas varía según la fuente alérgica, siendo las gramíneas las más susceptibles.

La polimerización de extractos alérgicos con GA produce una serie de modificaciones estructurales que conllevan a la pérdida de alergenidad de los extractos sin que su inmunogenicidad se vea afectada ¹⁸⁷. Los mecanismos implicados en la inmunogenicidad de los extractos polimerizados no se conocen bien y algunos autores han sugerido que la disminución de la alergenidad va acompañada de una pérdida de inmunogenicidad. Sin embargo, se ha demostrado que los extractos polimerizados presentan una elevada capacidad de estimular células T específicas de alérgeno *in vitro*, y que inducen la síntesis *in vivo* de IgG específica tras la inmunoterapia ¹⁸⁸⁻¹⁹¹.

En este trabajo, se ha analizado la capacidad inmunogénica de los extractos nativos y polimerizados mediante ensayos de proliferación de esplenocitos aislados del bazo de ratones inmunizados y la determinación del contenido de anticuerpos IgG e IgE específicos en el suero. Los resultados de cuantificación de endotoxina en las muestras revelaron un contenido en lipopolisacáridos (endotoxina) elevado y, aunque los ensayos realizados en ratones y cobayas han confirmado la ausencia de toxicidad, los resultados de proliferación y niveles de anticuerpos deben tomarse como una aproximación de la respuesta inducida por los extractos. No obstante, se ha descrito previamente que los β -glucanos (uno de los principales componentes de los hongos) interfieren en la cuantificación de endotoxina mediante la utilización del lisado de amebocitos de *Limulus*. Sería necesario realizar nuevos ensayos de cuantificación de endotoxina donde se elimine esta interferencia para determinar la cantidad real de endotoxina presente en los extractos y evaluar resultados de proliferación obtenidos.

Los ensayos de proliferación mostraron que la administración de extractos nativos y polimerizados de *A. alternata* por vía subcutánea a ratones, induce la maduración y diferenciación de linfocitos, los cuáles proliferan *in vitro* ante el estímulo con ambos tipos de extracto. La respuesta proliferativa observada tras una estimulación cruzada (estimulación con extracto polimerizado de células de ratones inmunizados con el extracto nativo, y viceversa) indica que ambos extractos presentan epítomos comunes. El análisis de anticuerpos en suero de los ratones inmunizados reveló que tanto el extracto nativo como el polimerizado

inducen la producción de anticuerpos IgG. Sin embargo, los niveles de anticuerpos IgG2a no mostraron diferencias significativas respecto a los ratones del grupo control y los niveles de IgG1 fueron significativamente superiores en los ratones inmunizados con los ambos extractos. Del mismo modo, los niveles de IgE también fueron superiores a los del grupo control en los sueros de ratones inmunizados con los extractos.

La ITA produce un aumento transitorio de los niveles de IgE específica en suero, que disminuirá gradualmente tras meses o años de tratamiento ¹²⁸. En humanos, se ha observado que durante la ITA con extractos alérgicos de ácaros los niveles de IgG se incrementan significativamente, pero la disminución de los niveles de IgE no se produce hasta transcurridos 70 días de tratamiento ¹⁹². Así, los cambios producidos en los niveles de IgE durante la ITA no pueden explicar la disminución de la reacción frente a alérgenos específicos puesto que se producen relativamente tarde y no se correlacionan con una mejoría clínica ¹²⁸. Se ha propuesto que los diferentes subtipos de IgG humana, especialmente la IgG4 (IgG1 en ratones), ejercen un papel protector mediante la captura del alérgeno antes de que alcance los anticuerpos IgE ligados a los FcεRI de mastocitos y basófilos y mediante la supresión de respuestas T específicas por la inhibición de la unión de complejos IgE-alérgeno a células presentadoras de antígeno ^{123, 128, 193-195}. El aumento de los niveles de IgG4 durante la inmunoterapia tampoco se correlaciona con la mejoría clínica de los pacientes ¹²⁸, por lo que se ha sugerido que el éxito de la IT específica está asociada con un incremento en la actividad bloqueadora de los anticuerpos IgG, que no sólo depende de la cantidad, sino también de la afinidad de éstos por los antígenos ¹⁹⁶. Vrtala y col. observaron que la inmunización de ratones con alérgenos naturales y recombinantes de *Phleum* spp. inducía la producción de anticuerpos IgG1 con capacidad inhibidora de la unión de IgE humana a los alérgenos, impidiendo la degranulación de basófilos ¹⁹⁷. Rosewich y col. también observaron el papel bloqueador de la IgG producida tras el tratamiento de pacientes con alergoides de pólenes ¹⁹⁸. En este trabajo se analizó, mediante *Western blot* de inhibición, la especificidad que presentaban los anticuerpos IgG producidos en ratones por los epítomos alérgicos de los extractos, a los que se unen los anticuerpos IgE (de pacientes sensibilizados a *Alternaria* spp.). Al comparar los resultados obtenidos con el perfil alérgico sin inhibición, se detectó la

desaparición de prácticamente todas las bandas en el extracto nativo y en el extracto polimerizado, al inhibir con los sueros de los dos grupos de ratones inmunizados. Estos resultados sugieren que los anticuerpos IgG generados por la administración de extractos nativos y polimerizados, están dirigidos frente a epítomos alergénicos, por lo que podrían tener un papel bloqueador de la unión de IgE.

Estos datos indican que extractos polimerizados son inmunogénicos y que su administración a pacientes sensibilizados a *A. alternata*, podría ser efectiva en la inducción de respuestas inmunológicas ante una exposición natural a alérgenos de *A. alternata*, promoviendo la producción de anticuerpos IgG específicos, con capacidad bloqueadora de la unión de IgE. Sin embargo, sería necesario complementar estos estudios con otros, como el análisis de citoquinas producido tras la estimulación de esplenocitos o la proliferación y estimulación de células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica humana, que ayuden a determinar el tipo de respuesta que inducen estos extractos y evaluar su papel protector tras un periodo de un año de inmunoterapia.

Conclusiones

VIII. CONCLUSIONES

1. La composición del medio de cultivo y la forma en que los nutrientes se encuentran disponibles determinan la composición molecular de los extractos alergénicos de *A. alternata*.
2. La utilización de un medio de cultivo líquido suplementado con fructosa incrementa el rendimiento proteico total obtenido, respecto al medio semisólido, sin afectar al contenido relativo de su alérgeno principal, Alt a 1.
3. La precipitación de extractos alergénicos de *A. alternata* con acetona no afecta a su composición proteica, la capacidad de unión IgE de los alérgenos ni a su actividad enzimática, por lo que es un método eficaz para la concentración y purificación de alérgenos.
4. La diálisis frente una solución salina tamponada (PBS) y el aumento de la relación glutaraldehído/proteína permiten la polimerización de los alérgenos de *A. alternata*.
5. Los extractos polimerizados de *A. alternata* presentan una composición proteica y de carbohidratos similar a la de los extractos nativos.
6. El contenido alergénico de los extractos se mantiene tras la reacción de polimerización.
7. Se han identificado en los extractos diferentes proteínas con funciones homólogas a las de alérgenos descritos en varias fuentes alergénicas, cuyas secuencias presentan más de un 50% de similitud, superando el 70 y el 90% de similitud en algunos casos.
8. Estas proteínas pueden ser consideradas como alérgenos potenciales y, algunas de ellas como responsables de fenómenos de reactividad cruzada.
9. Los extractos polimerizados de *A. alternata* presentan una alergenidad *in vitro* e *in vivo* disminuida.
10. La disminución de su actividad proteolítica no sólo puede afectar a su alergenidad sino que permite considerar su combinación con extractos alergénicos de *P. pratense* o *D. pteronyssinus*, sin que éstos se vean afectados.
11. Los extractos polimerizados presentan capacidad inmunogénica.

12. La administración de estos extractos por vía subcutánea a ratones BALB/c induce la diferenciación de linfocitos y la producción de anticuerpos IgG específicos frente alérgenos naturales de *A. alternata*.
13. Estos anticuerpos parecen presentar un efecto bloqueador de la unión de anticuerpos IgE.
14. Los extractos alérgénicos de *A. alternata* polimerizados con glutaraldehído suponen un nuevo método de vacunación para el tratamiento de pacientes sensibilizados a este hongo.

Bibliografía

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Pawankar R, Canonica GW, Holgate ST, et al. Introduction and Executive Summary. In World Allergy Organization (WAO) White Book on Allergy. Ruby Pawankar GWC, Stephen T. Holgate, Richard F. Lockey (Ed), 2011; 11-22.
2. Pawankar RS, Sánchez-Borges M, Bonini S, et al. Allergic rhinitis, allergic conjunctivitis, and rhinosinusitis. In WAO White book on allergy: Update 2013. Ruby Pawankar GWC, Stephen T. Holgate, Richard F. Lockey, Michael S. Blaiss (Ed): World Allergy Organization, 2013; 27-34.
3. WHO. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach. 2007.
4. Pawankar R. Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action. World Allergy Organ J 2014; 7:12.
5. WHO. WHO factsheet 206: bronchial asthma. Available at: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs206/en Mar 2017.
6. Ibanez MD, and Garde JM. Allergy in patients under fourteen years of age in Alergologica 2005. J Investig Allergol Clin Immunol 2009; 19 Suppl 2:61-68.
7. Custovic A, and Simpson A. The role of inhalant allergens in allergic airways disease. J Investig Allergol Clin Immunol 2012; 22:393-401; quiz follow 401.
8. Quirce S. Asthma in Alergologica-2005. J Investig Allergol Clin Immunol 2009; 19 Suppl 2:14-20.
9. Agarwal R, and Gupta D. Severe asthma and fungi: current evidence. Med Mycol 2011; 49 Suppl 1:S150-157.
10. Kennedy JL, Heymann PW, and Platts-Mills TA. The role of allergy in severe asthma. Clin Exp Allergy 2012; 42:659-669.
11. Cramer R, Garbani M, Rhyner C, et al. Fungi: the neglected allergenic sources. Allergy 2014; 69:176-185.
12. Bousquet J, Lockey RF, and HJ. M. WHO Position Paper. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. . Allergy 53:1-42.

13. Berrens L. Procedimiento para la fabricación de alérgenos inmunogénicos polimerizados. España, 1990.
14. Himly M, Carnes J, Fernandez-Caldas E, et al. Characterization of allergoids. *Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut (Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel) Langen/Hessen* 2009; 96:61-69; discussion 69-70.
15. Carnes J, Himly M, Gallego M, et al. Detection of allergen composition and in vivo immunogenicity of depigmented allergoids of *Betula alba*. *Clin Exp Allergy* 2009; 39:426-434.
16. Apostolovic D, Luykx D, Warmenhoven H, et al. Reduction and alkylation of peanut allergen isoforms Ara h 2 and Ara h 6; characterization of intermediate- and end products. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1834:2832-2842.
17. van Hoffen E, van der Kleij HP, den Hartog Jager CF, et al. Chemical modification of peanut conglutin reduces IgE reactivity but not T cell reactivity in peanut-allergic patients. *Clin Exp Allergy* 2014; 44:1558-1566.
18. Bencharitiwong R, van der Kleij HP, Koppelman SJ, et al. Effect of chemical modifications on allergenic potency of peanut proteins. *Allergy and asthma proceedings* 2015; 36:185-191.
19. Hawksworth D. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 2001; 105:1422-1432.
20. Kurup VP. Fungal allergens. *Current Allergy and Asthma Reports* 2003; 3:416.
21. Simon-Nobbe B, Denk U, Poll V, et al. The spectrum of fungal allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 145:58-86.
22. Horner WE, Helbling A, Salvaggio JE, et al. Fungal allergens. *Clinical microbiology reviews* 1995; 8:161-179.
23. Lehrer SB, Aukrust L, and Salvaggio JE. Respiratory allergy induced by fungi. *Clinics in chest medicine* 1983; 4:23-41.
24. Gabriel MF, Postigo I, Tomaz CT, et al. *Alternaria alternata* allergens: Markers of exposure, phylogeny and risk of fungi-induced respiratory allergy. *Environ Int* 2016; 89-90:71-80.
25. Schell WA. Unusual fungal pathogens in fungal rhinosinusitis. *Otolaryngologic clinics of North America* 2000; 33:367-373.

26. Ogawa H, Fujimura M, Amaike S, et al. Eosinophilic pneumonia caused by *Alternaria alternata*. *Allergy* 1997; 52:1005-1008.
27. Ozbek Z, Kang S, Sivalingam J, et al. Voriconazole in the management of *Alternaria keratitis*. *Cornea* 2006; 25:242-244.
28. Romano C, Paccagnini E, and Difonzo EM. Onychomycosis caused by *Alternaria spp.* in Tuscany, Italy from 1985 to 1999. *Mycoses* 2001; 44:73-76.
29. Mayser P, Nilles M, and de Hoog GS. Case report. Cutaneous phaeohyphomycosis due to *Alternaria alternata*. *Mycoses* 2002; 45:338-340.
30. Singh B, and Denning DW. Allergic bronchopulmonary mycosis due to *Alternaria*: Case report and review. *Medical mycology case reports* 2012; 1:20-23.
31. Chowdhary A, Agarwal K, Randhawa HS, et al. A rare case of allergic bronchopulmonary mycosis caused by *Alternaria alternata*. *Med Mycol* 2012; 50:890-896.
32. Airola K, Petman L, and Makinen-Kiljunen S. Clustered sensitivity to fungi: anaphylactic reactions caused by ingestive allergy to yeasts. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 97:294-297.
33. Bush RK, and Prochnau JJ. *Alternaria*-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:227-234.
34. Twaroch TE, Curin M, Valenta R, et al. Mold allergens in respiratory allergy: from structure to therapy. *Allergy Asthma Immunol Res* 2015; 7:205-220.
35. Ricci S, Bruni M, Meriggi A, et al. Aerobiological monitoring of *Alternaria* fungal spores: a comparison between surveys in 1992 and 1993 and local meteorological conditions. *Aerobiologia* 1995; 11:195-199.
36. Gravesen S. On the connection between the occurrence of airborne microfungi and allergy symptoms. *Grana* 1981; 20:225-227.
37. Mitakakis TZ, Barnes C, and Tovey ER. Spore germination increases allergen release from *Alternaria*. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:388-390.

38. Feo Brito F, Alonso AM, Carnes J, et al. Correlation between Alt a 1 levels and clinical symptoms in *Alternaria alternata*-monosensitized patients. J Investig Allergol Clin Immunol 2012; 22:154-159.
39. Canova C, Heinrich J, Anto JM, et al. The influence of sensitisation to pollens and moulds on seasonal variations in asthma attacks. Eur Respir J 2013; 42:935-945.
40. Rodriguez-Rajo FJ, Iglesias I, and Jato V. Variation assessment of airborne *Alternaria* and *Cladosporium* spores at different bioclimatical conditions. Mycol Res 2005; 109:497-507.
41. de Ana SG, Torres-Rodriguez JM, Ramirez EA, et al. Seasonal distribution of *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Penicillium* species isolated in homes of fungal allergic patients. J Investig Allergol Clin Immunol 2006; 16:357-363.
42. Chakrabarti HS, Das S, and Gupta-Bhattacharya S. Outdoor airborne fungal spora load in a suburb of Kolkata, India: its variation, meteorological determinants and health impact. International journal of environmental health research 2012; 22:37-50.
43. Kasprzyk I. Aeromycology-main research fields of interest during the last 25 years. Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM 2008; 15:1-7.
44. Pulimood TB, Corden JM, Bryden C, et al. Epidemic asthma and the role of the fungal mold *Alternaria alternata*. J Allergy Clin Immunol 2007; 120:610-617.
45. Wolf J, O'Neill NR, Rogers CA, et al. Elevated atmospheric carbon dioxide concentrations amplify *Alternaria alternata* sporulation and total antigen production. Environ Health Perspect 2010; 118:1223-1228.
46. Peters JL, Muilenberg ML, Rogers CA, et al. *Alternaria* measures in inner-city, low-income housing by immunoassay and culture-based analysis. Ann Allergy Asthma Immunol 2008; 100:364-369.
47. Saijo Y, Sata F, Mizuno S, et al. Indoor airborne mold spores in newly built dwellings. Environmental health and preventive medicine 2005; 10:157-161.

48. Ishibashi M, Tonori H, Miki T, et al. Classification of patients complaining of sick house syndrome and/or multiple chemical sensitivity. *The Tohoku journal of experimental medicine* 2007; 211:223-233.
49. D'Amato G, Chatzigeorgiou G, Corsico R, et al. Evaluation of the prevalence of skin prick test positivity to *Alternaria* and *Cladosporium* in patients with suspected respiratory allergy. A European multicenter study promoted by the Subcommittee on Aerobiology and Environmental Aspects of Inhalant Allergens of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1997; 52:711-716.
50. Bousquet PJ, Hooper R, Kogevinas M, et al. Number of allergens to be tested to assess allergenic sensitization in epidemiologic studies: results of the European Community Respiratory Health Survey I. *Clin Exp Allergy* 2007; 37:780-787.
51. Mari A, Schneider P, Wally V, et al. Sensitization to fungi: epidemiology, comparative skin tests, and IgE reactivity of fungal extracts. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:1429-1438.
52. Bogacka E, Nittner-Marszalska M, Fal AM, et al. [Allergy to mould allergens as a risk factor for bronchial asthma in patients suffering from allergic rhinitis]. *Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego* 2003; 14:388-392.
53. Heinzerling L, Frew AJ, Bindslev-Jensen C, et al. Standard skin prick testing and sensitization to inhalant allergens across Europe-a survey from the GALEN network. *Allergy* 2005; 60:1287-1300.
54. Burbach GJ, Heinzerling LM, Edenharter G, et al. GA(2)LEN skin test study II: clinical relevance of inhalant allergen sensitizations in Europe. *Allergy* 2009; 64:1507-1515.
55. Heinzerling LM, Burbach GJ, Edenharter G, et al. GA(2)LEN skin test study I: GA(2)LEN harmonization of skin prick testing: novel sensitization patterns for inhalant allergens in Europe. *Allergy* 2009; 64:1498-1506.
56. Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica Ael. Alergológica. Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España. . Madrid, 1995.

57. Horst M, Hejjaoui A, Horst V, et al. Double-blind, placebo-controlled rush immunotherapy with a standardized *Alternaria* extract. J Allergy Clin Immunol 1990; 85:460-472.
58. Ciprandi G, and Cirillo I. Monosensitization and polysensitization in allergic rhinitis. European journal of internal medicine 2011; 22:e75-79.
59. Pereira C, Valero A, Loureiro C, et al. Iberian study of aeroallergens sensitisation in allergic rhinitis. European annals of allergy and clinical immunology 2006; 38:186-194.
60. Cardona Villa R, Yépes Núñez JJ, Salgado Vélez H, et al. Aspectos básicos de las reacciones de hipersensibilidad y la alergia. In Alergia Abordaje clínico, diagnóstico y tratamiento. Panamericana (Ed), 2010; 736.
61. Radauer C, Bublin M, Wagner S, et al. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. J Allergy Clin Immunol 2008; 121:847-852 e847.
62. Kobayashi T, Iijima K, Radhakrishnan S, et al. Asthma-related environmental fungus, *Alternaria*, activates dendritic cells and produces potent Th2 adjuvant activity. J Immunol 2009; 182:2502-2510.
63. Borger P, Koeter GH, Timmerman JA, et al. Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce interleukin (IL)-6 and IL-8 production in airway epithelial cell lines by transcriptional mechanisms. The Journal of infectious diseases 1999; 180:1267-1274.
64. Kauffman HF, Tomee JFC, van de Riet MA, et al. Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2000; 105:1185-1193.
65. Tai HY, Tam MF, Chou H, et al. Pen ch 13 allergen induces secretion of mediators and degradation of occludin protein of human lung epithelial cells. Allergy 2006; 61:382-388.
66. Lamhamedi-Cherradi S-E, Martin RE, Ito T, et al. Fungal proteases induce Th2 polarization through limited dendritic cell maturation and reduced production of IL-12. The Journal of Immunology 2008; 180:6000-6009.

67. Boitano S, Flynn AN, Sherwood CL, et al. *Alternaria alternata* serine proteases induce lung inflammation and airway epithelial cell activation via PAR2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011; 300:L605-614.
68. Chen JC, Chuang JG, Su YY, et al. The protease allergen Pen c 13 induces allergic airway inflammation and changes in epithelial barrier integrity and function in a murine model. *J Biol Chem* 2011; 286:26667-26679.
69. Snelgrove RJ, Gregory LG, Peiro T, et al. *Alternaria*-derived serine protease activity drives IL-33-mediated asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134:583-592 e586.
70. Di Girolamo F, Lante I, Muraca M, et al. The Role of Mass Spectrometry in the "Omics" Era. *Current organic chemistry* 2013; 17:2891-2905.
71. Malmstrom J, Lee H, and Aebersold R. Advances in proteomic workflows for systems biology. *Current opinion in biotechnology* 2007; 18:378-384.
72. Kustrzeba-Wojcicka I, Siwak E, Terlecki G, et al. *Alternaria alternata* and its allergens: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2014; 47:354-365.
73. Arroyo L, Puerta, L. . Importancia de los epítopes de carbohidratos en los alérgenos. *Salud UIS* 2003; 35:71-79.
74. Altmann F. The role of protein glycosylation in allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; 142:99-115.
75. Portnoy J, Olson I, Pacheco F, et al. Affinity purification of a major *Alternaria* allergen using a monoclonal antibody. *Annals of allergy* 1990; 65:109-114.
76. Ponton J. [The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin]. *Revista iberoamericana de micologia* 2008; 25:78-82.
77. Portnoy J, Pacheco F, Ballam Y, et al. Separation of *Alternaria* into protein and carbohydrate fractions with phenyl sepharose. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87:789-793.
78. Portnoy J, Pacheco F, Ballam Y, et al. The effect of time and extraction buffers on residual protein and allergen content of extracts derived from four strains of *Alternaria*. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91:930-938.
79. Esch RE. Manufacturing and standardizing fungal allergen products. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:210-215.

80. Wills-Karp M, Nathan A, Page K, et al. New insights into innate immune mechanisms underlying allergenicity. *Mucosal immunology* 2010; 3:104-110.
81. Shreffler WG, Castro RR, Kucuk ZY, et al. The major glycoprotein allergen from *Arachis hypogaea*, Ara h 1, is a ligand of dendritic cell-specific ICAM-grabbing nonintegrin and acts as a Th2 adjuvant in vitro. *J Immunol* 2006; 177:3677-3685.
82. Thorn J, and Rylander R. Airways inflammation and glucan in a rowhouse area. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998; 157:1798-1803.
83. Rylander R, and Lin RH. (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan - relationship to indoor air-related symptoms, allergy and asthma. *Toxicology* 2000; 152:47-52.
84. Douwes J. (1 \rightarrow 3)-Beta-D-glucans and respiratory health: a review of the scientific evidence. *Indoor Air* 2005; 15:160-169.
85. Green BJ, Zinovia Mitakakis T, and Tovey ER. Allergen detection from 11 fungal species before and after germination. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003; 111:285-289.
86. Achatz G, Oberkofler H, Lechenauer E, et al. Molecular cloning of major and minor allergens of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*. *Mol Immunol* 1995; 32:213-227.
87. Achatz G, Oberkofler H, Lechenauer E, et al. Molecular characterization of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum* allergens. *Advances in experimental medicine and biology* 1996; 409:157-161.
88. Breitenbach M, and Simon-Nobbe B. The allergens of *Cladosporium herbarum* and *Alternaria alternata*. *Chemical immunology* 2002; 81:48-72.
89. Shankar J, Singh BP, Gaur SN, et al. Recombinant glutathione-S-transferase a major allergen from *Alternaria alternata* for clinical use in allergy patients. *Mol Immunol* 2006; 43:1927-1932.
90. Ito K, Ishiguro A, Kanbe T, et al. Detection of IgE antibody against *Candida albicans* enolase and its crossreactivity to *Saccharomyces cerevisiae* enolase. *Clin Exp Allergy* 1995; 25:522-528.
91. Simon-Nobbe B, Probst G, Kajava AV, et al. IgE-binding epitopes of enolases, a class of highly conserved fungal allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:887-895.

92. Chang C-Y, Chou H, Tam MF, et al. Characterization of enolase allergen from *Rhodotorula mucilaginosa*. *Journal of Biomedical Science* 2002; 9:645-655.
93. Flückiger S, Scapozza L, Mayer C, et al. Immunological and structural analysis of IgE-mediated cross-reactivity between manganese superoxide dismutases. *International Archives of Allergy and Immunology* 2002; 128:292-303.
94. Horner WE, Reese G, and Lehrer SB. Identification of the allergen Psi c 2 from the basidiomycete *Psilocybe cubensis* as a fungal cyclophilin. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107:298-300.
95. Fluckiger S, Fijten H, Whitley P, et al. Cyclophilins, a new family of cross-reactive allergens. *Eur J Immunol* 2002; 32:10-17.
96. Glaser AG, Limacher A, Fluckiger S, et al. Analysis of the cross-reactivity and of the 1.5 Å crystal structure of the *Malassezia sympodialis* Mala s 6 allergen, a member of the cyclophilin pan-allergen family. *Biochem J* 2006; 396:41-49.
97. Shankar J, Gupta P, Sridhara S, et al. Immunobiochemical analysis of cross-reactive glutathione-S-transferase allergen from different fungal sources. *Immunological Investigations* 2005; 34:37-51.
98. Limacher A, Glaser AG, Meier C, et al. Cross-reactivity and 1.4-Å crystal structure of *Malassezia sympodialis* thioredoxin (Mala s 13), a member of a new pan-allergen family. *The Journal of Immunology* 2006; 178:389-396.
99. Glaser AG, Menz G, Kirsch AI, et al. Auto- and cross-reactivity to thioredoxin allergens in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy* 2008; 63:1617-1623.
100. Chou H, Wu KG, Yeh CC, et al. The transaldolase, a novel allergen of *Fusarium proliferatum*, demonstrates IgE cross-reactivity with its human analogue. *PLoS One* 2014; 9:e103488.
101. Gabriel MF, Postigo I, Gutierrez-Rodriguez A, et al. Alt a 15 is a new cross-reactive minor allergen of *Alternaria alternata*. *Immunobiology* 2016; 221:153-160.
102. Lai HY, Tam MF, Tang RB, et al. cDNA cloning and immunological characterization of a newly identified enolase allergen from *Penicillium*

- citrinum* and *Aspergillus fumigatus*. Int Arch Allergy Immunol 2002; 127:181-190.
103. Schneider PB, Denk U, Breitenbach M, et al. *Alternaria alternata* NADP-dependent mannitol dehydrogenase is an important fungal allergen. Clin Exp Allergy 2006; 36:1513-1524.
 104. Weichel M, Schmid-Grendelmeier P, Fluckiger S, et al. Nuclear transport factor 2 represents a novel cross-reactive fungal allergen. Allergy 2003; 58:198-206.
 105. Gabriel MF, Postigo I, Gutierrez-Rodriguez A, et al. Characterisation of *Alternaria alternata* manganese-dependent superoxide dismutase, a cross-reactive allergen homologue to Asp f 6. Immunobiology 2015; 220:851-858.
 106. Herrera-Mozo I, Ferrer B, Luis Rodriguez-Sanchez J, et al. Description of a novel panallergen of cross-reactivity between moulds and foods. Immunol Invest 2006; 35:181-197.
 107. Rid R, Simon-Nobbe B, Langdon J, et al. *Cladosporium herbarum* translationally controlled tumor protein (TCTP) is an IgE-binding antigen and is associated with disease severity. Mol Immunol 2008; 45:406-418.
 108. Rid R, Onder K, MacDonald S, et al. *Alternaria alternata* TCTP, a novel cross-reactive ascomycete allergen. Mol Immunol 2009; 46:3476-3487.
 109. Popescu FD. Cross-reactivity between aeroallergens and food allergens. World journal of methodology 2015; 5:31-50.
 110. Gabriel MF, González-Delgado P, Postigo I, et al. From respiratory sensitization to food allergy: Anaphylactic reaction after ingestion of mushrooms (*Agaricus bisporus*). Medical mycology case reports 2015; 8:14-16.
 111. Martínez J, Martínez A, Eraso E, et al. Estudio de reactividad cruzada entre *Alternaria alternata* y otros mohos de interés alergológico. Rev Iberoamer Micol 1994; 11:68-70.
 112. Salvaggio J, Seabury J, and Schoenhardt FA. New Orleans asthma. V. Relationship between Charity Hospital asthma admission rates, semiquantitative pollen and fungal spore counts, and total particulate aerometric sampling data. J Allergy Clin Immunol 1971; 48:96-114.

113. Dreborg S, and Grimmer O. Biological standardization of allergen extracts/preparations. *Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut, dem Georg-Speyer-Haus und dem Ferdinand-Blum-Institut zu Frankfurt aM* 1983;77-82.
114. Rosado AL. Desarrollo a ciclo completo de las primeras vacunas estandarizadas de alérgenos de ácaros para la inmunoterapia del asma en Cuba. In *Centro Nacional de Biopreparados: Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana*, 2008.
115. Carnes J, Fernandez-Caldas E, Gallego MT, et al. Pru p 3 (LTP) content in peach extracts. *Allergy* 2002; 57:1071-1075.
116. Carnes Sanchez J, Iraola VM, Sastre J, et al. Allergenicity and immunochemical characterization of six varieties of *Olea europaea*. *Allergy* 2002; 57:313-318.
117. Fernandez-Caldas E, Carnes J, Iraola V, et al. Comparison of the allergenicity and Ole e 1 content of 6 varieties of *Olea europaea* pollen collected during 5 consecutive years. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007; 98:464-470.
118. Cox L. Standardized allergen extracts: past, present and future. *Expert review of clinical immunology* 2005; 1:579-588.
119. Martínez J, Martínez A, Gutierrez G, et al. Influencia del proceso de obtención en la actividad alérgica y rendimiento de extractos de *Alternaria alternata*. *Rev Iberoamer Micol* 1994; 11:10-13.
120. Cruz A, Saenz de Santamaria M, Martinez J, et al. Fungal allergens from important allergenic fungi imperfecti. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1997; 25:153-158.
121. Mitakakis TZ, O'Meara TJ, and Tovey ER. The effect of sunlight on allergen release from spores of the fungus *Alternaria*. *Grana* 2003; 42:43-46.
122. Janeway CA, Travers P, Walport M, et al. *Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. 2003.
123. van Neerven RJ, Wikborg T, Lund G, et al. Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation. *J Immunol* 1999; 163:2944-2952.

124. Wachholz PA, Soni NK, Till SJ, et al. Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:915-922.
125. Palomares O, Yaman G, Azkur AK, et al. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol* 2010; 40:1232-1240.
126. Jutel M, and Akdis CA. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 2011; 66:725-732.
127. Akdis M, and Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133:621-631.
128. Akdis CA, and Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organ J* 2015; 8:17.
129. Matsuoka T, Shamji MH, and Durham SR. Allergen immunotherapy and tolerance. *Allergology International* 2013; 62:403-413.
130. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *Allergy* 1998; 53:1-42.
131. Criado Molina A, Guerra Pasadas F, Daza Munoz JC, et al. [Immunotherapy with an oral *Alternaria* extract in childhood asthma. Clinical safety and efficacy and effects on in vivo and in vitro parameters]. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2002; 30:319-330.
132. Dreborg S, Agrell B, Foucard T, et al. A double-blind, multicenter immunotherapy trial in children, using a purified and standardized *Cladosporium herbarum* preparation. I. Clinical results. *Allergy* 1986; 41:131-140.
133. Malling HJ, Dreborg S, and Weeke B. Diagnosis and immunotherapy of mould allergy. V. Clinical efficacy and side effects of immunotherapy with *Cladosporium herbarum*. *Allergy* 1986; 41:507-519.
134. Karlsson R, Agrell B, Dreborg S, et al. A double-blind, multicenter immunotherapy trial in children, using a purified and standardized *Cladosporium herbarum* preparation. II. In vitro results. *Allergy* 1986; 41:141-150.
135. Lizaso MT, Martinez A, Asturias JA, et al. Biological standardization and maximum tolerated dose estimation of an *Alternaria alternata* allergenic extract. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2006; 16:94-103.

136. Tabar AI, Lizaso MT, Garcia BE, et al. Double-blind, placebo-controlled study of *Alternaria alternata* immunotherapy: clinical efficacy and safety. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 2008; 19:67-75.
137. Lizaso MT, Tabar AI, Garcia BE, et al. Double-blind, placebo-controlled *Alternaria alternata* immunotherapy: in vivo and in vitro parameters. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 2008; 19:76-81.
138. Kuna P, Kaczmarek J, and Kupczyk M. Efficacy and safety of immunotherapy for allergies to *Alternaria alternata* in children. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:502-508 e501-506.
139. Kaad PH, and Ostergaard PA. The hazard of mould hyposensitization in children with asthma. *Clinical allergy* 1982; 12:317-320.
140. Ostergaard PA, Kaad PH, and Kristensen T. A prospective study on the safety of immunotherapy in children with severe asthma. *Allergy* 1986; 41:588-593.
141. Kespohl S, and Raulf M. Mould allergens: Where do we stand with molecular allergy diagnostics?: Part 13 of the series Molecular Allergology. *Allergo J Int* 2014; 23:120-125.
142. Patterson R, Suszko IM, Bacal E, et al. Reduced allergenicity of high molecular weight ragweed polymers. *J Allergy Clin Immunol* 1979; 63:47-50.
143. Klimek L, Uhlig J, Mosges R, et al. A high polymerized grass pollen extract is efficacious and safe in a randomized double-blind, placebo-controlled study using a novel up-dosing cluster-protocol. *Allergy* 2014; 69:1629-1638.
144. Chui WK, and Wan LS. Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres. *Journal of microencapsulation* 1997; 14:51-61.
145. Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques* 2004; 37:790-796, 798-802.

146. Patramani I, Katsiri K, Pistevou E, et al. Glutamic-aspartic transaminase--antitransaminase interaction: a method for antienzyme purification. *European journal of biochemistry* 1969; 11:28-36.
147. Migneault I, Dartiguenave C, Vinh J, et al. Comparison of two glutaraldehyde immobilization techniques for solid-phase tryptic peptide mapping of human hemoglobin by capillary zone electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* 2004; 25:1367-1378.
148. Grier TJ, LeFevre DM, Duncan EA, et al. Stability of standardized grass, dust mite, cat, and short ragweed allergens after mixing with mold or cockroach extracts. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007; 99:151-160.
149. Rans TS, Hrabak TM, Whisman BA, et al. Compatibility of imported fire ant whole body extract with cat, ragweed, *Dermatophagoides pteronyssinus*, and timothy grass allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2009; 102:57-61.
150. Esch RE, and Grier TJ. Allergen compatibilities in extract mixtures. *Immunol Allergy Clin North Am* 2011; 31:227-239, viii.
151. Grier TJ, LeFevre DM, Duncan EA, et al. Allergen stabilities and compatibilities in mixtures of high-protease fungal and insect extracts. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2012; 108:439-447.
152. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
153. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
154. Martinez J, Gutierrez A, Postigo I, et al. Variability of Alt a 1 expression by different strains of *Alternaria alternata*. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2006; 16:279-282.
155. Saenz-de-Santamaria M, Guisantes JA, and Martinez J. Enzymatic activities of *Alternaria alternata* allergenic extracts and its major allergen (Alt a 1). *Mycoses* 2006; 49:288-292.
156. Ramjagathesh R, Ebenezar, E.G. . Morphological and physiological characters of *Alternaria alternata* causing leaf blight disease of onion. *International Journal of Plant Pathology* 2012; 3:34-44.

157. Nagrale DT, Gaikwad, A. P., Sharma, L. Morphological and cultural characterization of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler blight of gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus ex J. D. Hook). Journal of Applied and Natural Science 2013; 5:171-178.
158. Koley S, Mahapatra, SS. Evaluation of culture media for growth characteristics of *Alternaria solani*, causing early blight of tomato. J Plant Pathol Microbiol 2015; S1: 005.
159. Gholve VM, Taware, M. R. and Wagh, S.S. Effect of different culture media, temperature and pH on growth and sporulation of *Alternaria carthami*. International journal of plant sciences 2015; 10:163-167.
160. Helm RM, Squillace DL, Aukrust L, et al. Production of an international reference standard alternaria extract. I. Testing of candidate extracts. International archives of allergy and applied immunology 1987; 82:178-189.
161. Steringer I, Aukrust L, and Einarsson R. Variability of antigenicity/allergenicity in different strains of *Alternaria alternata*. International archives of allergy and applied immunology 1987; 84:190-197.
162. Helm RM, Squillace DL, and Yunginger JW. Production of a proposed international reference standard *Alternaria* extract. II. Results of a collaborative trial. J Allergy Clin Immunol 1988; 81:651-663.
163. Portnoy J, Pacheco F, Barnes C, et al. Selection of representative *Alternaria* strain groups on the basis of morphology, enzyme profile, and allergen content. J Allergy Clin Immunol 1993; 91:773-782.
164. Schumacher MJ, and Jeffrey SE. Variability of *Alternaria alternata*: biochemical and immunological characteristics of culture filtrates from seven isolates. J Allergy Clin Immunol 1976; 58:263-277.
165. Vijay HM, Young NM, Jackson GE, et al. Studies on *Alternaria* allergens. V. Comparative biochemical and immunological studies of three isolates of *Alternaria tenuis* cultured on synthetic media. International archives of allergy and applied immunology 1985; 78:37-42.
166. Rathod SR, Chavan, A. M. . Extracellular hydrolytic enzymes action of *Alternaria* species under the influence of different nutritional sources. Journal of Ecobiotechnology 2010; 2:57-62.

167. Patil MyS, N. V. . Effect of fructose on extracellular production of proteases by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. J Indian Inst Sci 1983; 64:111-120.
168. Patil M, and Shastri NV. Purification and properties of proteases produced by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, regulation of production by fructose. Journal of Biosciences 1985; 9:1-11.
169. Twaroch TE, Curin M, Sterflinger K, et al. Specific antibodies for the detection of *Alternaria* allergens and the identification of cross-reactive antigens in other fungi. Int Arch Allergy Immunol 2016; 170:269-278.
170. Larsen JN, Houghton CG, Lombardero M, et al. Manufacturing and standardizing allergen extracts in Europe. In Allergens and Allergen Immunotherapy. Lockey R (Ed). New York: Informa Healthcare USA, 2008.
171. Wróblewska B. Food Allergens. In Chemical and Functional Properties of Food Components. Sikorski ZE (Ed): CRC Press, 2006.
172. Jeong KY, Son M, Lee JY, et al. Allergenic characterization of 27-kDa glycoprotein, a novel heat stable allergen, from the pupa of silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Korean medical science 2016; 31:18-24.
173. Nandakumar MP, Shen J, Raman B, et al. Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis. Journal of proteome research 2003; 2:89-93.
174. Carla J. S. M. Silva FS, Georg Gübitz, Artur Cavaco-Paulo. Chemical Modifications on Proteins Using Glutaraldehyde. Food Technol Biotechnol 2004; 42:51–56.
175. Cromwell ME, Hilario E, and Jacobson F. Protein aggregation and bioprocessing. The AAPS journal 2006; 8:E572-579.
176. Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. The AAPS journal 2006; 8:E501-507.
177. Vazquez-Rey M, and Lang DA. Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes. Biotechnol Bioeng 2011; 108:1494-1508.
178. Thomas CR, and Geer D. Effects of shear on proteins in solution. Biotechnology letters 2011; 33:443-456.
179. Song J. Why do proteins aggregate? "Intrinsically insoluble proteins" and "dark mediators" revealed by studies on "insoluble proteins" solubilized in pure water. F1000Res 2013; 2:94.

180. FAO/WHO. Rome, Italy: 2001. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology.
181. Holtfreter S, Kolata J, Stentzel S, et al. Omics Approaches for the Study of Adaptive Immunity to *Staphylococcus aureus* and the Selection of Vaccine Candidates. *Proteomes* 2016; 4.
182. Nelson HS, Ikle D, and Buchmeier A. Studies of allergen extract stability: the effects of dilution and mixing. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98:382-388.
183. Esch RE. Allergen immunotherapy: what can and cannot be mixed? *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:659-660.
184. Coop CA. Immunotherapy for mold allergy. *Clin Rev Allergy Immunol* 2014; 47:289-298.
185. Kordash TR, Amend MJ, Williamson SL, et al. Effect of mixing allergenic extracts containing *Helminthosporium*, *D. farinae*, and cockroach with perennial ryegrass. *Annals of allergy* 1993; 71:240-246.
186. Cox L, Nelson H, Lockey R, et al. Allergen immunotherapy: a practice parameter third update. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:S1-55.
187. Marsh DG, Lichtenstein LM, and Campbell DH. Studies on "allergoids" prepared from naturally occurring allergens. I. Assay of allergenicity and antigenicity of formalinized rye group I component. *Immunology* 1970; 18:705-722.
188. Cirkovic TD, Bukilica MN, Gavrovic MD, et al. Physicochemical and immunologic characterization of low-molecular-weight allergoids of *Dactylis glomerata* pollen proteins. *Allergy* 1999; 54:128-134.
189. Kahler H, Stuwe H, Cromwell O, et al. Reactivity of T cells with grass pollen allergen extract and allergoid. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 120:146-157.
190. Ibarrola I, Sanz ML, Gamboa PM, et al. Biological characterization of glutaraldehyde-modified *Parietaria judaica* pollen extracts. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:303-309.
191. Gallego MT, Iraola V, Himly M, et al. Depigmented and polymerised house dust mite allergoid: allergen content, induction of IgG4 and clinical response. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 153:61-69.

192. Jutel M, Akdis M, Budak F, et al. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003; 33:1205-1214.
193. Flicker S, Linhart B, Wild C, et al. Passive immunization with allergen-specific IgG antibodies for treatment and prevention of allergy. *Immunobiology* 2013; 218:884-891.
194. Cooke RA, Barnard JH, Hebard S, et al. Serological evidence of immunity with coexisting sensitization in a type of human allergy (hay fever). *The Journal of experimental medicine* 1935; 62:733-750.
195. Lichtenstein LM, Holtzman NA, and Burnett LS. A quantitative in vitro study of the chromatographic distribution and immunoglobulin characteristics of human blocking antibody. *J Immunol* 1968; 101:317-324.
196. Shamji MH, Francis JN, Wurtzen PA, et al. Cell-free detection of allergen-IgE cross-linking with immobilized phase CD23: inhibition by blocking antibody responses after immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132:1003-1005.e1001-1004.
197. Vrtala S, Ball T, Spitzauer S, et al. Immunization with purified natural and recombinant allergens induces mouse IgG1 antibodies that recognize similar epitopes as human IgE and inhibit the human IgE-allergen interaction and allergen-induced basophil degranulation. *J Immunol* 1998; 160:6137-6144.
198. Rosewich M, Schulze J, Eickmeier O, et al. Tolerance induction after specific immunotherapy with pollen allergoids adjuvanted by monophosphoryl lipid A in children. *Clinical and Experimental Immunology* 2010; 160:403-410.

Anexo

ANEXO: ENSAYOS DE TOXICIDAD



Avda. de los Reyes, nº-59
28770 Colmenar Viejo (MADRID)
Tel.: 91 846 26 93 | www.biolab.com.es

n/ Ref:	Control LRC-266816
s/ Ref:	---

Empresa: Inmunotek, S.L.
Domicilio: Calle Punto Mobi, 5 – Alcalá de Henares - Madrid

Fecha de recepción: 17-Agosto-16
Fecha del informe: 30-Agosto-16

Ensayo: Toxicidad Anormal

Producto: Extracto nativo polimerizado, Alternaria alternata
Nº de lote: AP16G1/AAAL-02-16L

Fecha del ensayo: 18-08-16
Fecha de resultados: 25-08-16

Método analítico	Farmacopea Europea 8ª Ed. 2014
Especie animal / cepa	Ratón / NMRI
Número de animales / peso	5 / 18-24 g
Sexo especie	Hembras
Vía de administración ambas especies	Subcutánea
Dosis administrada	Dosis humana de 10 mg en un vial de 0,5 ml
Diluyente empleado	N/A
P.N.T. de referencia	LTAN-002
Tiempo de observación	7 días

Ratones control ponderal					
Peso Inicial	19	20	18	23	19
Peso Final	24	26	25	29	22

Observaciones:

Síntomas anormales de toxicidad: ninguno

Resultado:

De acuerdo con los requerimientos del método, el resultado del ensayo para este producto es de ausencia de toxicidad.


Ana Escario
Director Técnico



n/ Ref:	Control LRC-276916
s/ Ref:	---

Empresa: Inmunotek, S.L.
Domicilio: Calle Punto Mobi, 5 – Alcalá de Henares - Madrid

Fecha de recepción: 31-Agosto-16
Fecha del informe: 7-Septiembre-16

Ensayo: Toxicidad Anormal en Inmunosueros y vacunas

Producto: Extracto nativo polimerizado, Alternaria alternata
Nº de lote: AP16G1/AAAL-02-16L

Fecha del ensayo: 31-08-16
Fecha de resultados: 07-09-16

Método analítico	Farmacopea Europea 8ª Ed. 2014
Especie animal / cepa	Cobayo / Dunkin-Hartley
Número de animales / peso	2 / 250-400 g
Especie animal / cepa	Ratón / NMRI
Número de animales / peso	5 / 18-24 g
Sexo para ambas especies	Hembras
Vía de administración ambas especies	i.p.
Dosis administrada	10 µg/ml
P.N.T. de referencia	LTAN-002
Tiempo de observación	7 días

Cobayos control ponderal		
Peso Inicial	305	292
Peso Final	329	310

Ratones control ponderal					
Peso Inicial	22	18	18	18	22
Peso Final	26	23	24	24	26

Observaciones:

Síntomas anormales de toxicidad: ninguno

Resultado:

De acuerdo con los requerimientos del método, el resultado del ensayo para este producto es de ausencia de toxicidad.


Ana Escario
Director Técnico